

Contribuição para o estudo de infecção por
Treponema pallidum subespécie *pallidum*: resposta serológica,
diagnóstico molecular e genotipagem

Rita Maria Rodrigues Teixeira de Castro
Instituto de Higiene e Medicina Tropical
Universidade Nova de Lisboa
Lisboa 2004

Dissertação de candidatura ao Grau de Doutor no
Ramo de Ciências Biomédicas – especialidade
Microbiologia pela Universidade Nova de Lisboa –
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

ÍNDICE

ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
Capítulo 1. Introdução geral	1
1. Perspectiva histórica.....	3
2. Características de <i>Treponema pallidum</i> subespécie <i>pallidum</i>	8
2.1. Taxonomia e classificação.....	8
2.2. Características do género <i>Treponema</i>	9
2.3. Características de <i>Treponema pallidum</i> subespécie <i>pallidum</i>	12
2.3.1. Características morfológicas e estruturais	12
2.3.2. Características do genoma.....	18
2.3.3. Características culturais.....	23
3. Patogénese	24
4. Epidemiologia e transmissão	30
5. História natural da doença e manifestações clínicas.....	35
5.1. História natural da doença	35
5.2. Manifestações clínicas.....	38
5.2.1. Complexo primário	38
5.2.2. Período secundário	39
5.2.3. Sífilis latente.....	41
5.2.4. Sífilis tardia	42
5.3. Sífilis e infecção por VIH	45
6. Diagnóstico laboratorial	52
6.1 Métodos de detecção directa de <i>Treponema pallidum</i>	52
6.1.1. Microscopia de fundo escuro.....	53

6.1.2. Teste de imunofluorescência directa (DFA-TP).....	55
6.1.3. Coloração pela prata.....	57
6.1.4. Detecção directa de antígeno.....	57
6.1.4.1. Inoculação em modelo animal.....	57
6.1.4.2. Teste imunoenzimático directo	58
6.1.4.3. Sondas de ADN	59
6.1.4.4. Reacção em cadeia da polimerase (PCR).....	60
6.1.4.5. Multiplex – PCR (M-PCR)	64
6.1.4.6. Reacção da transcriptase reversa (RT-PCR)	66
6.2. Métodos serológicos.....	67
6.2.1. Testes não treponémicos.....	68
6.2.2. Testes treponémicos	74
6.2.2.1. Teste de imunofluorescência indirecta (Fluorescent Treponema Antibody Absorbed - FTA-Abs).....	76
6.2.2.2. Testes de aglutinação.....	78
6.2.2.3. Técnicas imunoenzimáticas	81
6.2.2.4. Técnicas de Western-blot.....	82
6.2.2.5. Testes rápidos para pesquisa de anticorpos anti- <i>T. pallidum</i>	84
6.2.3. Pesquisa de Anticorpos anti <i>T. pallidum</i> do tipo IgM.....	85
6.2.4. Métodos para detecção de anticorpos no liquor.....	87
6.2.5. Diagnóstico laboratorial nos diferentes estádios clínicos	87
7. Terapêutica	95
8. Prevenção e controlo.....	102
9. Objectivos gerais.....	104
Capítulo 2. Pesquisa de anticorpos anti-<i>Treponema pallidum</i> no sangue	105
1. Introdução.....	107
2. Material e métodos.....	109
2.1. População.....	109
2.2. Teste VDRL – Disease Research Laboratory	112
2.3. Teste RPR – Rapid Plasma Reagin	112
2.4. Teste de imunofluorescência indirecta.....	113
2.5. Teste de hemaglutinação (TPHA).....	115

2.6. Teste de aglutinação (TP.A)	116
2.7. Teste imunoenzimático (EIA)	117
2.8. Técnica de Western blot	118
3. Resultados	122
3.1. Comparação dos testes não treponémicos	122
3.2. Monitorização do resultado da terapêutica com os testes não- treponémicos	124
3.3. Avaliação dos testes não treponémicos em doentes infectados por VIH.....	126
3.4. Relação do teste RPR com a infecção por VIH e toxicodependência...	129
3.5. Avaliação de uma técnica de hemaglutinação – TPHA	132
3.6. Avaliação de uma técnica de aglutinação – TPPA	134
3.7. Avaliação de uma técnica imunoenzimático – EIA.....	138
3.8. Avaliação de uma técnica Western blot.....	142
4. Discussão e conclusões.....	148
Capítulo 3. Pesquisa de anticorpos anti-<i>Treponema pallidum</i> no liquor.	167
1. Introdução.....	169
2. Material e métodos.....	173
2.1. População.....	173
2.2. Exame citoquímico do liquor	174
2.3. Testes serológicos.....	174
3.Resultados.....	175
4. Discussão e conclusões.....	183
Capítulo 4. Pesquisa de ADN de <i>Treponema pallidum</i>	191
1. Introdução.....	193
2. Material e métodos.....	200
2.1. População.....	200
2.2. Amplificação de ADN de <i>Treponema pallidum</i> (PCR – diagnóstica)	201
2.3. Subtipagem genómica de <i>Treponema pallidum</i>	205
2.3.1. Análise de gene <i>tpr</i> por nested PCR – RFLP.....	205
2.3.2. Análise de gene <i>arp</i> por PCR	207
2.4. Prevenção de contaminações nas reacções da PCR.....	209

2.5. Estudo de amostras clínicas.....	209
3. Resultados	211
3.1. Optimização da PCR-diagnóstica	211
3.2. Resultados PCR-diagnóstica das amostras clínicas	218
3.3. Subtipagem de <i>Treponema pallidum</i>	229
3.3.1. Análise do gene <i>tpr</i> por “nested PCR – RFLP”	229
3.3.2. Análise do gene <i>arp</i> por técnica de amplificação	231
3.4. Subtipagem de <i>Treponema pallidum</i> em amostras clínicas	232
4. Discussão e conclusões.....	234
Capítulo 5. Conclusões gerais e perspectivas futuras.....	253
1. Discussão e conclusões finais	255
5.2. Perspectivas futuras	262
Bibliografia	265
Bibliografia	267

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia de <i>T. pallidum</i> subespécie <i>pallidum</i> estirpe de Nichols, obtida por microscopia electrónica.....	13
Figura 2. Fotografia de <i>T. pallidum</i> obtida por microscopia electrónica em corte transversal.....	14
Figura 3. Distribuição dos genes codificantes de proteínas, e classificação dos mesmos.....	18
Figura 4. Grupo de proteínas de repetição (Tpr) de <i>T. pallidum</i> ,.....	22
Figura 5. Disseminação e espiroquetémia após infecção por <i>T. pallidum</i>	25
Figura 6. Distribuição de sífilis precoce por zona geográfica.....	33
Figura 7. Distribuição de sífilis precoce por grupo etário e por sexo.....	33
Figura 8. Distribuição etária da população.....	110
Figura 9. Média de idades por sexo da população estudada.....	110
Figura 10. Comparação (%) dos resultados dos testes VDRL e RPR.....	122
Figura 11. Distribuição das infecções por VIH e por <i>T. pallidum</i> na população estudada.....	127
Figura 12. Distribuição da população estudada pela infecção por VIH e pela toxicodependência.....	130
Figura 13. Distribuição da falsa reactividade do teste RPR em relação com a infecção por VIH (%).....	131
Figura 14. Distribuição da falsa reactividade do teste RPR em relação com a toxicodependência (%).....	131
Figura 15. Optimização das condições de amplificação de um fragmento do gene <i>Tp47</i> com as sequências iniciadoras KO3A/KO4.	211
Figura 16. Visualização dos produtos de amplificação de ADN de amostras clínicas com a utilização das sequências iniciadoras KO4A/KO3.....	212
Figura 17. Optimização das condições de amplificação de um fragmento do gene <i>Tp47</i> de <i>T. pallidum</i> com as sequências iniciadoras 47-F/47-R.	213
Figura 18. Optimização da técnica de PCR-diagnóstica com as sequências iniciadoras <i>polA-F/polA-R</i> utilizando-se controlo positivo e diferentes concentrações de MgCl ₂	214
Figura 19. Visualização dos produtos de amplificação de ADN de amostras	

clínicas, com a utilização das sequências iniciadoras <i>polA-F/polA-R</i>	214
Figura 20. Resultados obtidos pela aplicação da técnica de PCR otimizada utilizando-se as sequências iniciadoras <i>polA-F/polA-R</i> (PE)	215
Figura 21. Otimização da PCR-M, com as sequências iniciadoras 47-R/47-F e <i>polA-F/polA-R</i>	217
Figura 22. Otimização da técnica de PCR-M com as sequências iniciadoras KO4A/KO3 e <i>polA-F/polA-R</i>	218
Figura 23. Otimização da primeira amplificação da técnica de “nested-PCR” do gene <i>tpr</i>	229
Figura 24. Otimização da segunda amplificação da técnica de “Nested-PCR” para o gene <i>tpr</i>).	230
Figura 25. Padrão de RFLP obtido com a enzima de restrição <i>MseI</i> aplicada ao produto de nested-PCR do ADN de <i>T. pallidum</i>	231
Figura 26. Otimização da amplificação por PCR de um fragmento do gene <i>arp</i>	232

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características diferenciais das espécies patogénicas do género <i>Treponema</i>	10
Tabela 2. História dos testes para diagnóstico de sífilis – detecção directa de antígeno	53
Tabela 3 – Sensibilidade dos métodos de detecção directa de <i>T. pallidum</i>	55
Tabela 4. Cronologia dos testes não treponémicos	69
Tabela 5. Quadro de sensibilidade e de especificidade dos testes não treponémicos	72
Tabela 6 -Cronologia dos testes treponémicos.....	76
Tabela 7. Quadro de sensibilidade e especificidade de testes treponémicos.....	80
Tabela 8. Critérios de diagnóstico de sífilis precoce.....	88
Tabela 9. Critérios de diagnóstico de sífilis tardia.....	89
Tabela 10. Origem da população estudada.....	109
Tabela 11. Grupos populacionais estudados	111
Tabela 12. Resultados obtidos com os testes VDRL e RPR	122
Tabela 13. Sensibilidade e especificidade dos testes VDRL e RPR em comparação com o teste FTA-Abs	123
Tabela 14. Monitorização do resultado da terapêutica em doentes com sífilis primária	125
Tabela 15. Monitorização do resultado da terapêutica em doentes com sífilis secundária.....	125
Tabela 16. Monitorização do resultado da terapêutica em doentes com sífilis latente	126
Tabela 17. Resultados obtidos com os testes RPR e VDRL na população sem infecção por VIH.....	127
Tabela 18. Resultados obtidos com os testes RPR e VDRL na população com infecção por VIH.....	128
Tabela 19. Resultados da falsa reactividade do teste RPR em relação à infecção por VIH e toxicodependência.....	130
Tabela 20. Resultados obtidos com os testes RPR e TPHA no soro de indivíduos dos vários grupos estudados.....	133
Tabela 21. Resultados obtidos com os testes TPHA e FTA-Abs-G	133

Tabela 22. Resultados obtidos com os testes TP.PA e TPHA.....	135
Tabela 23. Resultados obtidos com os testes TP.PA e FTA-ABS.....	135
Tabela 24. Monitorização do resultado da terapêutica de doentes com sífilis primária aos seis e 12 meses com os testes RPR, TPHA e TP.PA.....	136
Tabela 25. Monitorização do resultado da terapêutica de doentes com sífilis secundária aos seis e 12 meses com os testes RPR, TPHA e TP.PA	137
Tabela 26. Monitorização do resultado da terapêutica de doentes com sífilis latente aos seis e 12 meses com os testes RPR, TPHA e TP.PA.....	138
Tabela 27. Resultados obtidos com os testes EIA-G e TPHA	139
Tabela 28. Resultados obtidos com os testes EIA-G e FTA-Abs	139
Tabela 29. Sensibilidade e especificidade dos testes RPR, TPHA e EIA-G em comparação com o teste FTA-Abs-G.....	140
Tabela 30. Resultados da pesquisa de anticorpos de tipo IgM específicos em diferentes estádios de sífilis pelos testes FTA-Abs-M e EIA-M.	142
Tabela 31. Resultados obtidos com os testes FTA-Abs-G, TPHA e Western blot na globalidade dos soros estudados.....	143
Tabela 32. Resultados obtidos com os testes Western blot e TPHA	143
Tabela 33. Resultados obtidos com os testes Western blot e FTA-Abs-G.....	144
Tabela 34. Resultados obtidos com os testes TPHA, Western blot e FTA-Abs-G, no soro de indivíduos dos vários grupos estudados.....	145
Tabela 35. Resultados obtidos com os testes WB – M e FTA-Abs-M no soro de indivíduos dos vários grupos estudados.....	146
Tabela 36. Características diferenciais entre os testes VDRL e RPR	148
Tabela 37. Resultados obtidos com os testes serológicos e exame citoquímico nas amostras de liquor	175
Tabela 38. Resultados obtidos com os testes VDRL e RPR nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo sintomático	176
Tabela 39. Resultados obtidos com os testes FTA-Abs, TPHA, TP.PA e Western blot, nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo sintomático.....	177
Tabela 40. Resultados obtidos com os testes VDRL e RPR nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo assintomático	178
Tabela 41. Dicriminação dos resultados obtidos nos testes treponémicos e exame citoquímico das amostras de liquor nas quais os testes não treponémicos foram negativos.....	179

Tabela 42. Resultados obtidos com os testes FTA-Abs e TPHA nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo assintomáticos	180
Tabela 43. Resultados obtidos com os testes FTA-Abs e TP.PA nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo assintomáticos	181
Tabela 44. Resultados obtidos com os testes FTA-Abs e Western blot nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo assintomáticos	182
Tabela 45. Sequências de oligonucleótidos para a PCR – Diagnóstica	203
Tabela 46. Sequências iniciadoras para amplificação do gene <i>tpr</i>	206
Tabela 47. Sequências iniciadoras para amplificação do gene <i>arp</i>	208
Tabela 48. Resultados obtidos nas diversas amostras clínicas analisadas pelas técnicas de PCR-diagnóstica	219
Tabela 49. Resultados obtidos no total de amostras (140) estudadas por todas as técnicas de PCR-diagnóstica	220
Tabela 50. Resultados obtidos pela técnica de PCR-47 nos diferentes tipos de amostras	221
Tabela 51. Resultados obtidos pela técnica de PCR- <i>polA</i> nos diferentes tipos de amostras	221
Tabela 52. Resultados obtidos pela técnica de PCR-M nos diferentes tipos de amostras	222
Tabela 53. Resultados obtidos com a técnica de PCR-47 nas várias amostras, de acordo com o diagnóstico clínico e laboratorial do grupo I.....	222
Tabela 54. Resultados obtidos com a técnica de PCR- <i>polA</i> nas várias amostras de acordo com o diagnóstico clínico e laboratorial do grupo I	223
Tabela 55. Resultados obtidos com a técnica de PCR-M de acordo com o diagnóstico clínico e laboratorial do grupo I.....	223
Tabela 56. Resultados obtidos com as várias técnicas PCR-diagnóstica nas amostras de liquor.....	225
Tabela 57. Resultados obtidos nas amostras de liquor de acordo com o tipo de técnica PCR-diagnóstica utilizada	225
Tabela 58. Resultados obtidos nos testes serológicos e exame citoquímico das amostras de liquor em que todas as técnicas de PCR-diagnóstica foram negativas.....	226
Tabela 59. Resultados obtidos nos testes serológicos e exame citoquímico das amostras de liquor em que todas as técnicas de PCR-diagnóstica foram	

positivas	227
Tabela 60. Discriminação dos resultados discordantes obtidos nas amostras de liquor , com as técnicas PCR-diagnóstica.....	228
Tabela 61. Resultados obtidos na subtipagem de <i>T. pallidum</i> de amostras sangue, plasma, soro e de exsudados de biopsia de lóbulo de orelha e de lesões.....	233

Agradecimentos

O presente trabalho foi possível graças ao contributo de muitos amigos, colegas e familiares que com a sua disponibilidade, o seu apoio, encorajamento incentivo e críticas me ajudaram a concretizar esta tarefa. A todos o meu mais sincero obrigada.

Seria da mais elementar injustiça deixar de expressar a minha gratidão a duas amigas que de um modo mais directo, com o seu incentivo e colaboração foram fundamentais na elaboração deste trabalho:

A Professora Doutora Filomena Exposto, colega e amiga, que tendo-me acolhido na Unidade de DST, foi decisiva na opção por este tema de estudo. Através do seu incentivo, da sua ajuda não só científica como amiga, da sua preocupação constante, e da sua aprovação quando necessária, foram-me permitidos ultrapassar os momentos “menos bons”.

A Senhora Dr.^a Emília Prieto, pelo seu apoio e colaboração incondicional na execução prática dos estudos laboratoriais e sobretudo pela sua amizade, fundamental nestes anos de convívio e trabalho em comum.

Esta dívida de gratidão não se pode pagar tão simplesmente como a escrita destas linhas; terá de o ser diariamente pelo tempo fora.

Este trabalho, não seria, também, uma realidade sem a ajuda de todos aqueles que ao longo destes anos, partilharam comigo a sua amizade e cooperação. A todos expresso o meu reconhecimento.

À Professora Doutora Wanda Cana Ferreira pelo seu acolhimento quando da minha entrada na carreira docente, tendo-me transmitido o seu entusiasmo pela investigação.

Aos colegas dos Serviços de Infecçologia dos Hospitais de Garcia de Orta e Egas Moniz, e das consultas de Medicina Interna da Maternidade Dr. Alfredo da Costa e Consulta de DST do Centro de Saúde da Lapa, sem os quais, este trabalho não teria sido realizável.

Aos Professores Doutora Aida Esteves e Doutor Carolino Monteiro, o meu muito obrigada pela orientação e conselhos que muito contribuíram para a realização das técnicas de biologia molecular.

Aos Professores Vittorio Sambri de Bolonha e Alan Pillay do CDC de Atlanta, pela hospitalidade, ensinamentos e colaboração na execução das técnicas de

Western-blot e de subtipagem molecular.

Ao Senhor Professor Doutor Francisco Antunes, da Unidade de Protozoários/Oportunistas/VIH, o meu muito obrigada pela sua disponibilidade na revisão exaustiva deste texto.

À Senhora Dr.^a Luzia Gonçalves pela ajuda na análise estatística.

A todos os elementos das Unidades de Virologia e Micobactérias, a quem peço perdão por não nomear mas que pelo seu número tornar-se-ia fastidioso e para os quais guardo no coração a minha de gratidão. A todos muito e muito obrigada.

Aos meus queridos Quim, Joana, Miguel e João pelo seu amor.

Resumo

A sífilis é uma doença sexualmente transmitida, reconhecida como tal desde o século XVI, cujo agente etiológico é *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, para o qual não existe meio de cultura artificial. Sendo uma infecção com inúmeras manifestações clínicas, incluindo a fase de latência e não havendo uma técnica que possa ser um verdadeiro teste padrão, o seu diagnóstico clínico e laboratorial afigura-se muitas vezes difícil.

Nesta tese foram avaliados vários testes – Venereal Disease Research Laboratory (VDRL), Rapid Plasma Reagin Test (RPR), *Treponema pallidum* Hemagglutination Antibody (TPHA), Fluorescent Treponemal Antibody Absorption (FTA-Abs), Passive Particle Agglutination Test (TP.PA), teste imunoenzimática (SYPHILIS-EIA) e Western-blot – para a pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* e técnicas de biologia molecular – reacção em cadeia da polimerase (PCR) – para o diagnóstico da sífilis nos seus diferentes estádios, incluindo neurosífilis. Experimentaram-se várias sequências iniciadoras (47-F/47-R, *polA*-F/*polA*-R-(PE), KO3A/KO4 e *polA*-F/*polA*-R) para amplificação de fragmentos dos genes da lipoproteína de 47kDa e do ADN polimerase I, e diferentes tipos de amostras: exsudado de úlceras genitais e de lesões cutâneas de secundarismo, exsudado de biopsias do lóbulo da orelha, sangue total, plasma, soro e liquor.

Foram também optimizadas técnicas de PCR para a genotipagem de *Treponema pallidum* (amplificação de um fragmento do gene *tpr* e do gene *arp*) as quais foram aplicadas em algumas amostras incluídas neste estudo.

Com a técnica de RPR obtiveram-se resultados idênticos ao VDRL no sangue e no liquor, pelo que parece que ambas as técnicas podem ser indiscriminadamente utilizadas nos dois tipos de produtos.

Com os testes treponémicos obtiveram-se também, resultados semelhantes no liquor e no sangue. No entanto, as diferenças encontradas indicam que: a) o FTA-Abs, o Western-blot e o TP.PA devem ser os testes a utilizar nas fases precoces da infecção; b) o teste EIA parece indicado no caso de um grande número de amostras; c) o TP.PA e o TPHA podem ser utilizados na rotina laboratorial e, o primeiro eventualmente, também, na monitorização da terapêutica; d) o FTA-Abs e o Western-blot são os testes treponémicos que, de

preferência devem ser utilizados no diagnóstico de neurosífilis embora os resultados do TP.PA se comparem aos do TPHA, no caso da infecção do sistema nervoso central por *Treponema pallidum*.

A co-infecção com o VIH parece, ter efeito apenas, na reactividade dos testes não treponémicos, ocasionando falsa reactividade, independentemente da existência simultânea de toxicodependência.

Em relação à técnica de PCR para o diagnóstico de sífilis, e para as várias sequências iniciadoras experimentadas os melhores resultados obtiveram-se com o par KO3A/KO4. A sensibilidade da técnica de PCR e de genotipagem nas amostras das úlceras genitais e das lesões cutâneas de sífilis secundária foi de 100%, o mesmo não acontecendo quando as técnicas se aplicaram à identificação de *Treponema pallidum* no sangue e no liquor, pelo que a técnica de PCR aplicada a este tipo de amostras necessita de ser aperfeiçoada. No entanto o exsudado de biopsia do lóbulo da orelha, seguida do plasma são os produtos, em que mais vezes, se identificou ADN de *Treponema pallidum*.

O genótipo de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* mais frequentemente encontrado foi o 14c, sendo que o genótipo 10a foi pela primeira vez identificado no presente estudo.

Summary

Syphilis is a sexually transmitted disease, which has been recognized since the 16th century. *T. pallidum* subspecies *pallidum* is the etiological agent, for which there is no artificial culture media. As this infection has a variety of clinical manifestations, including a latent phase, and since there is no test that can be considered a true “gold standard”, its clinical and laboratory diagnosis is sometimes rather difficult.

In this thesis a number of laboratory tests for the detection the of antibodies against *T. pallidum* were evaluated – Venereal Disease Laboratory (VDRL), Rapid Plasma Reagin (RPR), *Treponema pallidum* Hemagglutination Antibody (TPHA), Fluorescent Treponemal Antibody Absorption (FTA-Abs), *Treponema pallidum* Passive Particle Agglutination Antibody (TPPA), EIA antibodies (SYPHILIS – EIA) and Western blot.

Molecular biology techniques were developed and optimised for the diagnosis of syphilis in different stages, including neurosyphilis. Different primers were evaluated (47-F/47-R, *polA*-F/*polA*-R-(PE), KO3A/KO4 e *polA*-F/*polA*-R) for the amplification of the 47kDa protein and DNA polymerase I gene fragments. Different types of samples were also studied - genital ulcers and skin lesions exudates, ear lobe biopsy, total blood, plasma, sera and cerebral spinal fluid (CSF) - in view of verifying in which of them the PCR technique would be more sensitive.

The RPR results were identical to those obtained with the VDRL, both in blood and CSF. Therefore, it seems that the techniques can be used in either product. The results obtained with the different treponemal tests evaluated in this study were also quite similar in blood and CSF. However, some differences were found, which indicate that: a) the FTA-Abs, the Western blot and the TP.PA should be used to diagnose early phases of disease; b) the EIA test seems to be indicated when there is a high number of samples; c) the TPPA and the TPHA tests may be used in laboratory routine work and the first in following up patients; d) the FTA – Abs and the Western blot are the treponemal tests that should be used preferentially for the diagnosis of neurosyphilis. One should also mention that the TPPA can also be used to diagnose *Treponema pallidum*.

central nervous system infection, since the results of this test were similar to those obtained with the TPHA.

Co-infection with HIV seems to cause false positive results only in non - treponemal tests and that is independent of simultaneous existence of drug addiction.

In relation to the PCR technique for the diagnosis of syphilis and for the different primers tried, the best results were obtained with the pair KO3/KO4.

The sensitivity of both the PCR and the genotyping techniques was found to be high (100%) in genital ulcers and cutaneous lesions exudates. The same does not apply when these techniques were used in blood and cerebrospinal fluid, although when ear lobe biopsy and plasma samples were used, *T. pallidum* DNA was identified more often.

The most frequently *T. pallidum* subspecies *pallidum* genotype found was the 14c. To our knowledge, genotype 10a was identified for the first time in this study.

Abreviaturas

ADN	-	Ácido desoxiribonucleico
ARN	-	Ácido ribonucleico
<i>arp</i>	-	“Acidic repeat protein”
ATP	-	Adenosina trifosfato
C	-	Citocina
CDC	-	“Centers for Disease Control and Prevention”
CN	-	Controlo negativo
CO ₂	-	Dióxido de carbono
CP	-	Controlo positivo
CTP	-	Citidina trifosfato
DFA-TP	-	“Direct fluorescent antibody staining for <i>T. pallidum</i> ”
dNTP	-	Desoxinucleótidos
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EIA	-	“Enzyme immunoassay” – técnica imunoenzimática
ELISA	-	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
FTA-abs	-	“Fluorescent treponemal antibody absorption”
G	-	Guanina
GTP	-	Guanosina trifosfato
H ₂ O	-	Água destilada
HCl	-	Ácido clorídrico
IF	-	Imunofluorescência
IgG	-	Imunoglobulina G
IgM	-	Imunoglobulina M
IST	-	Infecção Sexualmente Transmitida
KDa	-	Kilodalton
LCR	-	Líquido céfalo-raquidiano
M	-	Molar
mARN	-	Ácido ribonucleico mensageiro
MgCl ₂	-	Cloreto de magnésio
MHA-TP	-	Microhaemagglutination for antibodies to <i>T. pallidum</i>
ml	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
M-PCR	-	Multiplex-PCR
<i>msp</i>	-	Major outer sheath protein
°C	-	Graus Celsius
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
ORF	-	“Open Reading Frames”
pb	-	Pares de bases
PBS	-	Tampão fosfato salino

PCR	-	Reacção em cadeia da polimerase
Pmol	-	Picomoles
RIT	-	“Rabbit infectivity test
rARN	-	Ácido ribonucleico ribossómico
RFLP	-	“Restriction fragment length polymorphism”
rpm	-	Rotações por minuto
RPR	-	“Rapid plasma reagin”
SDS	-	Dodecil-sulfato de sódio
SIDA	-	Síndrome de Imunodeficiência adquirida
<i>Taq</i>	-	“ <i>Thermus aquaticus</i> ”
tARN	-	Ácido ribonucleico transferência
TBE	-	Tampão tris ácido bórico e EDTA
TPHA	-	“ <i>T. pallidum</i> haemagglutination assay”
TPI	-	Teste de imobilização de <i>T. pallidum</i>
<i>tp</i>	-	“Treponemal repeat protein”
TTP	-	Timidina trifosfato
U	-	Unidades
VDRL	-	“Venereal Diseases Research Laboratory”
VIH	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
WHO	-	“World Health Organisation”
μM	-	Micromolar
μg	-	Microgram
μl	-	Microlitre

Capítulo 1. Introdução geral

1. Perspectiva histórica

A sífilis surgiu subitamente na Europa, como uma grande pandemia, no final do século XV. A doença foi mencionada por Ruy Diaz de Isla em 1539, relatando que em 1493, pouco tempo após o regresso de Cristóvão Colombo e da sua tripulação, a população de Barcelona foi atingida por uma doença desconhecida até então, com um quadro clínico de erupções ou boubas. No entanto, a maioria dos historiadores, considera como primeira epidemia europeia a que surge mais tarde nos anos 1494/5 (Baker e Armelagos 1988). A disseminação da infecção parece ter sido facilitada pelas movimentações militares durante a guerra existente entre o rei D. Carlos VIII de França e o rei de Nápoles. Nessa altura, as tropas francesas teriam sido enviadas para Itália numa tentativa de recuperar a cidade de Nápoles, enquanto que nesta cidade se encontravam tropas provenientes de Espanha para auxiliar o rei desta cidade. Os mercenários que integravam ambos os exércitos, oriundos de toda a Europa, terão sido os principais responsáveis pela propagação da infecção, quando do regresso às suas terras de origem, no verão de 1495. Em 1496, a epidemia disseminou-se pela Holanda e em 1497 atingiu as ilhas Britânicas. Em 1500 encontrava-se espalhada por toda a Europa e manifestava-se com um quadro clínico dramático e mais severo que o actual (Davenport-Hines e Richard 1990, Caumes e Janvier 1995).

Ao longo dos anos a doença teve diversas designações. Após o seu aparecimento em Barcelona e disseminação por toda a Espanha denominou-se de “doença espanhola”. Quando surgiu em Itália e França e os primeiros casos foram registados na Alemanha, a sífilis foi chamada de “doença francesa”, “doença alemã”, e “mal de Nápoles”, enquanto que durante o século XVI e XVII foi conhecida como “great pox”, em oposição à varíola que era então designada como “small pox”. A designação actual resulta da analogia com Syphilus, o pastor protagonista de um poema intitulado “*Syphilis sive morbus gallicus*”, publicado em 1530, e escrito pelo médico e filósofo de Verona, Hieronymus Fracastorius (1478-1553). No poema é feita a descrição clínica da sífilis, doença

sexualmente transmitida, de que o pastor sofria. A designação, proposta na altura, acabou por ser adoptada no fim do século XVIII. Jean Fernel (1506-1558) chamou-lhe *lues venereum* (lues provém do latim que significa “praga ou pestilência”) e era originariamente aplicada a qualquer doença venérea, tendo-se tornado sinónimo de sífilis no início do século XX (Tramont 1990).

Os diversos historiadores são unânimes em afirmar que a epidemia de sífilis se propagou com intensidade sem precedentes através da Europa durante os séculos XV e XVI. Os surtos epidémicos mais precoces foram particularmente devastadores, provavelmente devido à ausência de imunidade natural. Os doentes sofriam de feridas abertas, febre de início súbito, dores ósseas e delírio, muitas vezes com prognóstico fatal, sobretudo na fase secundária.

Foi Joahannes Widman (1440-1524), também conhecido como Salicetus, quem reconheceu, pela primeira vez, a via de transmissão sexual. Este facto acabou por ter um certo impacto cultural, levando à regulamentação da utilização dos banhos públicos e das casas de prostituição e até ao seu encerramento em determinadas circunstâncias. A utilização de luvas e peruca parece estar, também, relacionada com as manifestações secundárias e terciárias da doença, segundo Meyer *et al.* (2002) enquanto que Ross *et al.* (1995) sugerem que a sífilis possa ter tido algum papel na perseguição às bruxas que teve lugar durante o século XVI. Na época surgiram várias hipóteses para justificar o aparecimento da doença, desde punição divina ou constelação cósmica a “mau ar” ou “mau sangue”, sendo invocadas ajudas de santos padroeiros e efectuadas peregrinações penitenciais. Até ao início do século XX, a sífilis dominou as preocupações médicas e sociais, com um largo cortejo de conceitos moralizantes e culpabilizantes (Janier e Saada 1989).

Ao longo dos anos foram muitos, aqueles, que contribuíram para o conhecimento actual da doença. John Hunter (1727-1793) acreditava na teoria unitária que assegurava que a sífilis e a gonorreia eram a mesma doença (Singh e Romanowski 1999), tendo por fundamento a experiência por si efectuada em 1767, na qual inoculou pús uretral de um doente no prepúcio e na glândula de um receptor (Dempster 1978). Dez dias após a inoculação surgiu uma úlcera seguida de manifestações de sífilis secundária. De acordo com os conhecimentos actuais, pensa-se que o dador teria uma infecção gonocócica em

curso, estando no segundo período de incubação da sífilis, que se segue ao estadio de sífilis recente, mas Hunter ficou convencido que tinha induzido sífilis com o pús gonocócico. Algum tempo depois William Wallace (1791-1837) demonstrou a infecciosidade das lesões cutâneas, do período secundário da sífilis, ao inocular indivíduos saudáveis com material destas lesões, refutando a teoria corrente na época de Hunter de que estas não eram infecciosas.

A teoria unitária de Hunter manteve-se até meados de século XIX, altura em que o sifilologista Philippe Ricord (1800-1889) demonstrou que a sífilis e a gonorreia eram doenças diferentes e propôs que fossem considerados os três estádios de sífilis: primária, secundária e terciária, ainda hoje utilizados. Alfred Fournier (1832-1914), aluno e seguidor de Philippe Ricord, que dedicou toda a sua vida ao estudo da sífilis, confirmou a origem sífilítica da neurosífilis (Sartin e Perry 1995) e descreveu a possibilidade de um recém-nascido de pais infectados poder nascer aparentemente saudável, só apresentando sinais da infecção anos mais tarde.

Também Paul Diday (1812-1894) e Jonathan Hutchinson (1828-1913) deram um grande contributo para o conhecimento da sífilis congénita. Este último, médico contemporâneo de Fournier, caracterizou as três lesões mais importantes desta infecção no recém-nascido, a queratite intersticial, o endurecimento do tímpano e os incisivos centrais recortados e de menor crescimento, hoje conhecidas como a tríade de Hutchinson.

No fim do século XIX a doença era conhecida como a “grande imitadora”, podendo simular muitas outras doenças, pelo que Sir William Osler (1849-1919) referiu “He who knows syphilis, knows medicine”. Esta característica de ser uma doença sistémica, difusa e insidiosa que pode simular muitas outras entidades clínicas é melhor compreendida após a identificação do seu agente, *Treponema pallidum*, por Schaudinn Hoffman em 1905 e pela confirmação da sua presença nas lesões de sífilis tardia. Esta identificação levou, então, ao desenvolvimento de um primeiro teste de diagnóstico serológico, o teste de fixação de complemento ou teste de Wasserman (1906), o qual permitiu evidenciar a sífilis latente (Hall 2002).

No entanto, e apesar dos conhecimentos actuais, a origem da sífilis continua a ser controversa (Baker e Armelagos 1988), sendo várias as teorias que tentam

explicar a origem e a subsequente disseminação desta infecção e das outras treponematoses, isto é a teoria pré-columbiana, a teoria columbiana, a teoria unitária ou evolucionária e a teoria alternativa (Larsen *et al.* 1998, Meyer *et al.* 2002).

A primeira admite que a sífilis e as outras treponematoses já existiriam no Velho Mundo, antes de Cristóvão Colombo ter regressado com os seus marinheiros da América, nunca tendo sido diferenciada de outras manifestações como a lepra e as outras treponematoses. Esta suposição baseava-se na existência de grande número de referências sobre a lepra (1200 - 1300), que alguns médicos da altura acreditavam ser uma doença sexualmente transmitida (Larsen *et al.* 1998), assim como nas descrições de “lepras temporárias”, curadas pelo uso de unguentos mercuriais e sobretudo pela administração oral de mercúrio. Este medicamento veio mais tarde a ser utilizado para a terapêutica da sífilis e teria sido já usado na antiguidade, pelos chineses, para o tratamento de uma lesão cutânea designada por “*Yinshi*” devida a contacto sexual (Larsen *et al.* 1998). Também, de acordo com os defensores desta hipótese, as infecções treponémicas seriam comuns e de severidade moderada. As alterações nos padrões de vida europeus da época, com melhores condições de vida sobretudo higiénicas, poderiam ter levado a que a disseminação das infecções treponémicas se tenha tornado menos comum, com menor transmissão por contacto cutâneo, diminuindo o risco de transmissão durante a infância e permitindo uma maior disseminação da transmissão sexual (Brothwell 1970).

Pelo contrário, os autores aderentes à teoria columbiana acreditam que foi a tripulação dos barcos de Cristóvão Colombo que trouxe o novo microrganismo para a Europa, em 1493. Aqueles que subscrevem a teoria colombiana postulam que a sífilis foi introduzida na Europa por aqueles marinheiros, quando do seu regresso da América e terá sido a falta de resistência natural a esse novo microrganismo que levou à disseminação rápida e grave da infecção por toda a população não imune da Europa em apenas alguns anos (Baker e Armelagos 1988). Esta teoria é fundamentada na existência de ossos do crânio e outros com evidência de lesões típicas de infecções por treponemas na América e na falta de documentação paleopatológica da existência de sífilis na

Europa, antes da descoberta da América. Também o estudo de múmias egípcias em 1900 não evidenciou lesões de tipo sífilítico, quer nos ossos, quer nos dentes, enquanto que, ossos do crânio de habitantes do Pacífico Oeste, datados de 834 DC, pelo método de carbono, apresentavam lesões de periostite (Goff 1967).

A teoria unitária ou evolucionária foi posta em evidência por Hudson (1946), que defendeu que todas as treponematoses teriam origem num único microrganismo que se manifestaria de modo diferente, de acordo com as condições ambientais locais. A sífilis venérea ter-se-ia desenvolvido quando grandes aglomerados populacionais começaram a formar-se nos meios urbanos, facilitando assim a disseminação sexual (Hudson 1963, 1965). Hackett (1963), sugeriu a existência de um único microrganismo desenvolvido na região Euro-Afro-Asiática 20.000 AC que teria evoluído para distintas espécies e subespécies localizadas em áreas geográficas diferentes. Assim a framboésia, infecção a *Treponema pallidum* subespécie *pertenue*, é hoje apenas encontrada nas regiões equatoriais; a sífilis endêmica, devida a *Treponema pallidum* subespécie *endemicum*, é endêmica nas regiões de clima quente e seco, a sífilis venérea, causada por *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, actualmente distribuída por todo o Mundo, no século XVI estava confinada às zonas de clima temperado, e a pinta, infecção a *Treponema carateum*, tem como limite o norte da América do Sul e Central, local em que, segundo Hackett, acabou por ficar limitada, quando devido ao aquecimento global, o estreito de Behring foi inundado cerca de 10.000 AC. Esta hipótese apoia-se no facto das três subespécies não se diferenciarem umas das outras por métodos fenotípicos ou com base em estudos de ADN, e na capacidade dos testes serológicos padrão para diagnóstico de sífilis apresentarem reactividade cruzada com as outras infecções treponémicas. Por outro lado, alguns investigadores conseguiram modificar a infecção experimental em coelhos, ajustando a temperatura ambiente, e demonstrando que as diferenças nas doenças treponémicas são mais dependentes dos factores ambientais do que das diferenças entre espécies (Turner e Hollander 1957, Hollander 1981).

Resta uma referência à teoria alternativa (Livingstone 1991), na qual não é estabelecida relação causal entre a descoberta do “Novo Mundo” e a ocorrência

da epidemia de sífilis na Europa, e que propõe África como possível origem deste microrganismo. Os contactos das populações entre os dois continentes, anteriores à descoberta das Américas, poderiam ter originado a oportunidade para que treponemas não venéreos tivessem sido trazidos para a Europa onde, ao adaptarem-se às novas condições, ambientais e de população, teriam evoluído originando a sífilis venérea.

Os novos métodos de genética molecular poderão ajudar a clarificar toda esta polémica. Por exemplo, os estudos efectuados por Centurion-Lara *et al.* (1998) permitiram a caracterização de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* pela presença de uma única base mutada na região 5' do gene da proteína de 15 kDa, diferenciando este treponema dos outros. Este passo foi importante para atribuição correcta do material paleontológico a uma doença específica, como aconteceu no estudo efectuado por Kolman *et al.* (1999), o qual permitiu identificação de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* numa amostra arqueológica, com 200 anos, da Ilha de Páscoa (Easter Island). Assim, o estudo por técnicas de genética molecular das espécies de *T. pallidum* em amostras arqueológicas de regiões e períodos temporais críticos permitirá responder à questão da origem da doença, fornecendo também informações sobre a sua evolução.

A construção da história da evolução da sífilis poderá permitir um avanço na compreensão da sua patologia, orientando, também, os investigadores para futuras áreas de pesquisa, como a evolução da doença e o desenvolvimento de vacinas.

2. Características de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*

2.1. Taxonomia e classificação

Treponema pallidum subespécie *pallidum*, o agente da sífilis, é uma espiroqueta do género *Treponema* pertencente à ordem das *Spirochaetales*. Esta subdivide-se em duas famílias – Spirochataceae e Leptospiraceae – e em sete géneros, dos

quais apenas os gêneros *Treponema*, *Borrelia* e *Leptospiras*, têm interesse médico, por serem capazes de causar doença, especialmente no ser humano (Smibert 1984, citado por Stamm 1999)

2.2. Características do gênero *Treponema*

Os microrganismos do gênero *Treponema* caracterizam-se por serem bacilos helicoidais, sendo constituídos por um cilindro protoplasmático, com flagelos periplasmáticos inseridos nas suas extremidades.

Apesar de apresentarem uma parede celular com estrutura semelhante às bactérias Gram negativo, a maior parte das espécies cora mal com os corantes de anilina, sendo coráveis pelos métodos de impregnação pela prata. São microrganismos anaeróbios estritos ou microaerofílicos, móveis, com movimentos de rotação e translação que podem ser observados utilizando a microscopia de fundo escuro.

As espécies treponêmicas que representam um problema de saúde pública por serem patogênicos para o homem, encontram-se sumarizadas na Tabela 1, e incluem *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, agente da sífilis venérea, *Treponema pallidum* subespécie *pertenue*, agente da framboésia, *Treponema pallidum* subespécie *endemicum*, causador da sífilis endêmica e *Treponema pallidum* subespécie *carateum*, agente etiológico da pinta. Nenhuma destas três espécies é cultivável em meios acelulares, sendo apenas propagáveis por inoculação intratesticular no coelho e de modo limitado em cultura de tecidos (Fieldsteel *et al.* 1981, Norris 1982, Cox 1994).

Várias outras espécies treponêmicas podem ser encontradas na cavidade oral, aparelhos gastrointestinal e genital, sendo na sua maioria cultiváveis e com patogenicidade limitada (Stamm 1999). Constitui exceção *Treponema denticola*, que se encontra na cavidade oral e é antigenicamente relacionada com *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* e pode ser responsável por periodontite crônica e gengivite aguda ulcerativa necrosante (Riviere *et al.* 1991a, 1991b).

Os treponemas patogênicos para o homem são, praticamente, indiferenciáveis

no que diz respeito à sua morfologia, fisiologia, homologia do ADN e conteúdo proteico. Até à utilização das técnicas de biologia molecular apenas se diferenciavam pela sua distribuição geográfica, modo de transmissão e tipo de alterações patogénicas que originavam no homem e nos animais infectados experimentalmente.

Tabela 1. Características diferenciais das espécies patogénicas do género *Treponema**

Características:	<i>Treponema pallidum</i> subsp.			<i>Treponema</i>
	<i>pallidum</i>	<i>pertunue</i>	<i>endemicum</i>	<i>carateum</i>
Hospedeiro natural:				
Humano	+	+	+	+
Patogenicidade no homem	muito invasiva; infecção local e sistémica: estádios recente, latente e tardio	moderadamente invasiva; lesões na pele e ossos	moderadamente invasiva; estádios recente, latente e tardio	sem envolvimento sistémico; lesões dérmicas
Infecções que originam	sífilis venérea	framboésia ou boubas	sífilis endémica ou bejel	pinta
Distribuição Geográfica	Mundial	Áreas tropicais de ambos os hemisférios	Norte de África, Médio Oriente, Europa do Leste e do Sul	América Central e do Sul
Clima	Temperado	Tropical e desértico	Temperado e desértico	Tropical
Lesão cutânea experimental				
Coelho	+	+	+	-
Hamster	-	+	+	-
Rato	-	-	-	-
Cobaio	a	-	+	-
Transmissão:				
Contacto sexual	+	-	-	-
Contacto cutâneo	-	+	-	-
Membranas mucosas	-	-	+	-
Infecção congénita	+	-	b	-

^a. Ocasionalmente observa-se pequena lesão no local da inoculação.

^b. Doença congénita rara.

*(Adaptado de Larsen *et al.* 1998 e Norris *et al.* 2001)

Alguns investigadores com base em técnicas de hibridização de ADN-ADN e análise da composição em guanina/citocina (G+C), determinaram o grau de homologia existente entre *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* (estirpe de Nichols) e as outras subespécies patogénicas (Miao e Fieldsteel 1980, Stanton *et al.* 1991) tendo demonstrado que se apresentavam fortemente relacionados e com homologia superior a 95%. Por outro lado, apresentaram homologia ADN/ADN inferior a 5%, quando comparados com o ADN de treponemas cultiváveis, como *Treponema phagedenis*, *Treponema refringens* e *Brachyspira hypodysenteriae* (anteriormente *Treponema hypodysenteriae*), tendo também a composição em G+C bastante diferente (Norris *et al.* 2001).

Os estudos de comparação, utilizando a sequenciação do 16s ARN ribossomal de *Treponema pallidum*, demonstraram identidade significativa com a sequência do ARN ribossomal de outras espécies de treponemas – *T. phagedenis*, *T. denticola* – e com duas espécies de *Spirochaeta*, isto é, *S. zuelzeri* e *S. stenostrepta* (Paster *et al.* 1991). Adicionalmente, observou-se que as espécies de *Treponema* e estas *Spirochaeta* continham filamentos citoplasmáticos, estruturas estas não observáveis nas outras bactérias incluídas em *Spirochaetales*, o que sugere uma relação evolutiva.

Numa tentativa de diferenciar os treponemas patogénicos, têm sido utilizadas técnicas de análise de sequência de genes, técnicas de polimorfismos de restrição (RFLP) e técnicas de reactividade a anticorpos monoclonais. Noordhoek *et al.* (1990), utilizando *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* estirpe de Nichols e *Treponema pallidum* subespécie *pertenue* estirpe CDC 2575, compararam a sequência do gene do antígeno 4D (190kDa) destas estirpes com a sequência do mesmo gene de dez estirpes de *Treponema* isoladas de doentes (quatro com o diagnóstico de sífilis e seis com o diagnóstico de framboésia), tendo concluído que esse gene diferia, apenas, num dos 936 nucleótidos (no resíduo 123). No entanto, essa diferença não foi observada em todos os microrganismos isolados, pelo que não deve ser utilizada para diferenciar as duas subespécies. Por outro lado, os mesmos investigadores não encontraram, também, qualquer diferença entre as duas subespécies (Noordhoek *et al.* 1990), quando estudaram a reactividade serológica com anticorpos monoclonais. Todos os anticorpos monoclonais reagiram com os antígenos de peso molecular

igual para ambas as subespécies, evidenciando, uma vez mais, serem microrganismos fortemente relacionados.

Os estudos de Centurion-Lara e seus colaboradores (1998) permitiram evidenciar pequenas diferenças, através da técnica de RFLP, na região 5' que flanqueia o gene (*tpp15*). Este gene codifica a lipoproteína de 15 kDa e a sua análise por RFLP pode ser utilizada para diferenciar *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* dos outros treponemas patogênicos, por aquele microrganismo apresentar um único ponto de restrição, "Eco 47III", na região 5' desse gene (Centurion-Lara *et al.* 1998).

A diferenciação entre os diferentes tipos de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* foi determinada pela sequenciação do seu genoma, o que permitiu a identificação de uma família de genes, os genes *Treponema pallidum repeat – tpr* (A-L), os quais parecem representar uma região com divergência genética dentro de um genoma altamente conservado (Fraser *et al.* 1998, Stamm *et al.* 1998 e Centurion-Lara *et al.* 1999). O estudo destes genes permitiu verificar diferenças inter-estirpes e intra-estirpes em microrganismos isolados de indivíduos com sífilis venérea (Pillay *et al.* 1998 e 2002, Sutton *et al.* 2001).

2.3. Características de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*

2.3.1. Características morfológicas e estruturais

Tal como as outras espiroquetas, *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* caracteriza-se por apresentar morfologia helicoidal com o corpo celular em forma de onda ou de saca-rolhas (Figura 1).

Devido às suas dimensões pequenas *T. pallidum* situa-se para além do poder de resolução do microscópio óptico, sendo apenas observável por microscopia de fundo escuro ou por microscopia electrónica.

Este microrganismo tem forma de hélice com espiras ou ondas regulares (Norris *et al.* 2001), de 5 – 15 µm de comprimento medido ao longo do eixo longitudinal

e 0,16 – 0,20 μm de diâmetro. Em perfil sinusoidal, apresenta um comprimento de onda e uma amplitude de cerca de 1,1 μm e 0,4 μm . Tal como as outras espiroquetas, *T. pallidum* apresenta dupla membrana, compartilhando características tanto com as bactérias que coram negativamente como com aquelas que o fazem positivamente pela coloração de Gram.

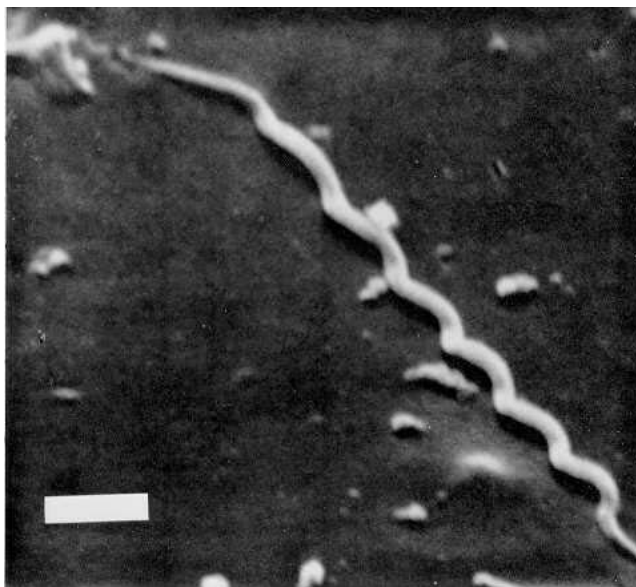


Figura 1. Fotografia de *T. pallidum* subespécie *pallidum* estirpe de Nichols, obtida por microscopia electrónica (Adaptado de Fitzgerald *et al.* 1977).

O estudo ultramicroscópico desta bactéria permitiu definir uma membrana externa, um espaço periplasmático, uma camada de peptidoglicano, uma membrana citoplasmática ou interna e um cilindro protoplásmico (Figura 2). A membrana externa limita a superfície celular externa, constituindo uma barreira protectora relativamente ao meio ambiente, e a membrana citoplasmática rodeia ou circunda o cilindro protoplasmático.

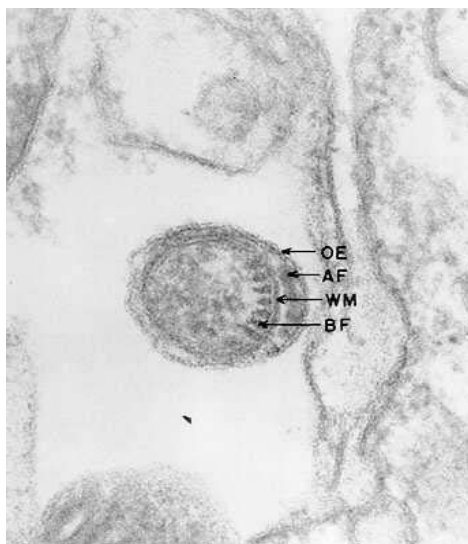


Figura 2. Fotografia de *T. pallidum* obtida por microscopia electrónica em corte transversal. Abreviaturas: OE (membrana externa), AF (flagelo), WM (membrana celular), BF (cilindro protoplasmático). (Adaptado de Johnson *et al.* 1973)

Entre uma e outra, encontra-se o espaço periplasmático com os órgãos de locomoção – flagelos ou filamentos axiais – (Charon *et al.* 1992 e Norris *et al.* 1993), que pela sua localização se chamam flagelos periplasmáticos ou endoflagelos. Estes inserem-se em grupos de dois a quatro nas extremidades da célula treponémica, em pontos de inserção dispostos paralelamente ao eixo da hélice. Os flagelos enrolam-se à volta do cilindro protoplasmático helicoidal e entrecruzam-se perto da região central do microrganismo. A forma em espiral e a localização periplasmática do flagelo permitem ao microrganismo manter a mobilidade em meios viscosos, como os fluídos ocular e articular e ainda, na matriz extra-celular da pele (Charon *et al.* 1992).

Em oposição à membrana citoplasmática observa-se uma camada electrodensa que foi identificada por microscopia electrónica de camada fina (Hovind-Hogen 1972). Esta camada electrodensa, que nem sempre é claramente visível, corresponde ao peptidoglicano, conforme foi evidenciado por estudos bioquímicos (Radolf *et al.* 1989) que demonstraram a presença de ácido murâmico.

Membrana externa

A membrana externa constitui a superfície celular do microrganismo em contacto mais íntimo com o hospedeiro, sendo também a estrutura onde se deveriam encontrar os mais importantes componentes associados à virulência bacteriana. Pelo contrário, neste microrganismo isso parece não se verificar, visto que uma das suas propriedades mais interessantes e intrigantes é a de possuir uma superfície de baixa antigenicidade. Isto mesmo foi confirmado por diferentes autores que demonstraram que *T. pallidum* apresenta baixa concentração de proteínas transmembranárias, aproximadamente cem vezes menos que nas outras espiroquetas e bactérias que coram negativamente pelo Gram (Radolf *et al.* 1989 e 1995a, Cox *et al.* 1992, Norris *et al.* 1993) as quais se encontram ligadas covalentemente aos lípidos pelos seus radicais amino-terminais. Também, ao contrário do que sucede na constituição das membranas externas daquelas bactérias, a de *T. pallidum* não apresenta lipopolissacarídeos (LPS), que se encontram em grande abundância nas membranas externas das bactérias de coloração Gram negativo (Bailey *et al.* 1985, Penn *et al.* 1985, Radolf *et al.* 1988). Essa característica é evidenciada pela análise do genoma (Fraser *et al.* 1998), que demonstrou ausência de genes que codifiquem enzimas para a bio-síntese de lipopolissacarídeos (LPS). Apresenta, no entanto, um alto conteúdo em lípidos com uma razão lípido/proteína elevada (Radolf *et al.* 1995a).

Flagelo periplasmático e mobilidade

No que se refere à estrutura em geral, o endoflagelo de *T. pallidum* é composto por três estruturas: um corpo basal, um gancho e um filamento (Hovind-Hougen 1972). Os genes correspondentes às proteínas do corpo basal e ao gancho foram identificados em operações do genoma (Frazer *et al.* 1998) e a sua mutação noutras espiroquetas leva à perda da mobilidade (Charon *et al.* 1992, Limberger *et al.* 1994 e 1999, Li *et al.* 1996, Ruby *et al.* 1997). O filamento

flagelar é composto por um “core” interno (10nm de diâmetro) e por uma bainha externa. Estes são constituídos por quatro proteínas designadas flagelinas e subdivididas em duas classes: A e B. A flagelina de classe A (FlaA), é um polipeptídeo de 37 kDa constituinte da bainha do flagelo, enquanto que o “core” é composto por três classes de moléculas de flagelina com massas moleculares de 34.500 (FlaB₁), de 33.000 (FlaB₂) e de 30.000 (FlaB₃) (Penn *et al.* 1985, Cockayne *et al.* 1987, Norris *et al.* 1988).

O flagelo é um órgão importante, não só devido à sua função de locomoção, como também à sua natureza antigénica. A mobilidade constitui um dos factores de virulência de *T. pallidum*, porque dela depende a invasão e disseminação tecidual. O movimento de translação em saca-rolhas característico das espiroquetas permite-lhes o movimento em meios com viscosidade aumentada (Canale Parole 1978, Kimsey e Spielman 1990), onde pode atingir a velocidade de 19 mm por segundo (Kimsey e Spielman 1990, Ruby e Charon 1998). Em meios não viscosos o movimento de translação resulta numa vigorosa rotação, podendo reverter rapidamente ao encontrar um obstáculo e, através da sua capacidade de flexão, alterar o seu rumo.

Como referido, o flagelo é uma estrutura de natureza antigénica, estimulando uma resposta de anticorpos precoce que persiste durante a infecção. O estudo da actividade de um anti-soro anti-flagelo em testes de imobilização de *T. pallidum* e a inactividade do mesmo em testes de imobilização modificada têm sugerido que o flagelo pode constituir um alvo na resposta da imunidade humoral do hospedeiro (Blanco *et al.* 1990).

A presença de epítomos específicos de *T. pallidum* (Norris *et al.* 1993), na região central das proteínas flagelina FlaB, permitiu o desenvolvimento de testes serológicos mais específicos para o diagnóstico laboratorial de sífilis (Ebel *et al.* 2000, Sambri *et al.* 2001a).

Membrana citoplasmática

A membrana citoplasmática de *T. pallidum* apresenta uma ultraestrutura semelhante à das outras bactérias que coram negativamente pela coloração de Gram (Lugtenberg e Van Alphen 1983, Radolf *et al.* 1989, Walker *et al.* 1989),

com um folheto interno com partículas intramembranas em alta concentração, em contraste com a face interna da membrana externa (Radolf *et al.* 1989, Walker *et al.* 1989).

Diversos estudos demonstraram que *T. pallidum* continha lipoproteínas abundantes e imunogénicas (Chamberlain *et al.* 1989, Schouls *et al.* 1989, Purcell *et al.* 1990, Swancutt *et al.* 1990, Yelton *et al.* 1991, Norris *et al.* 1993). Muitas dessas lipoproteínas, tais como Tpp47, Tpp17, Tpp15 e talvez GlpQ – glicerofosfodiesterase – (Shevchenko *et al.* 1999) associam-se predominantemente com o folheto periplasmático da membrana citoplasmática. A sua pobre antigenicidade é explicada por esta arquitectura estrutural pouco usual, já que não se observa reactividade dos anticorpos contra essas proteínas na presença do microrganismo íntegro, a qual surge quando a membrana externa é rompida (Cox *et al.* 1995).

Como constituintes da membrana citoplasmática foram identificadas, também, proteínas de ligação à penicilina (Cunningham *et al.* 1987, Radolf *et al.* 1989) e cardiolipina, embora esta esteja presente em quantidade mínima na membrana externa, explicando assim a actividade opsónica do anticorpo, pesquisado pelos testes serológicos que utilizam como antigénio este componente lipídico (Radolf *et al.* 1995, Shevchenko *et al.* 1997).

Filamentos citoplasmáticos

Uma característica de *T. pallidum* subespécie *pallidum*, de outros membros do género *treponema* e de algumas espécies de espiroquetas é a presença de filamentos citoplasmáticos situados por baixo da membrana citoplasmática, em oposição directa ao flagelo periplasmático. Estes apresentam uma estrutura fibrilar (Yuo *et al.* 1996) em faixas paralelas com 7,0 a 7,5 nm de largura, tendo origem junto dos corpos basais do flagelo, não se sabendo se se estendem por todo o comprimento da célula ou se terminam na sua porção média, tal como o endoflagelo.

Outros constituintes citoplasmáticos

Estudos efectuados com diferentes colorações (Hovind-Hougen 1972) e microscopia electrónica demonstraram a presença de ribossomas, assim como a presença de outras estruturas citoplasmáticas como mesossomas, vacúolos e regiões nucleares.

O genoma contém duas cópias de genes ARN ribossomal típicas de bactérias em arranjo 16S-23S-5S (Frazer *et al.* 1998) contendo, também, genes de codificação de proteínas ribossomais em pequenos e grandes operões, assim como em genes isolados.

2.3.2. Características do genoma

A sequenciação do genoma de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* (Nichols) foi completada em 1998 (Frazer *et al.* 1998), tendo-se verificado que o ADN genómico deste microrganismo é composto por um único cromossoma circular (Figura 3) com 1,138,006 pares de bases (pb) e com conteúdo em guanina e citosina (% mol G+C) de 52,8%.

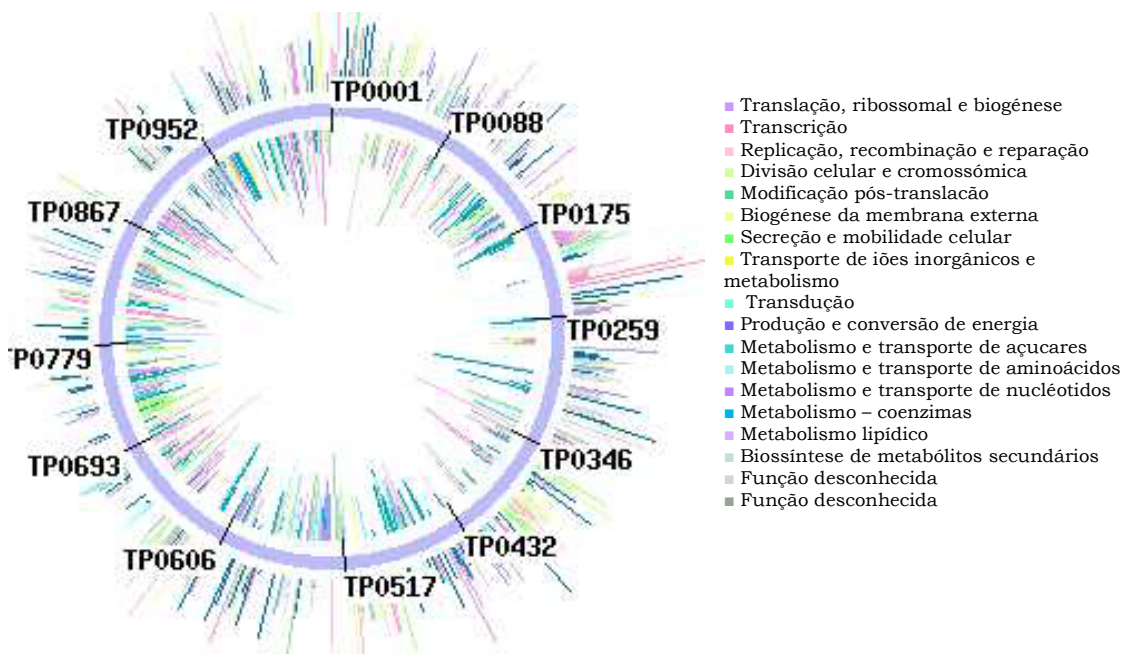


Figura 3. Distribuição dos genes codificantes de proteínas, e classificação dos mesmos (adaptado NCBI - 2001).

Mil e quarenta e uma sequências de codificação – “open reading frames” – (ORF) – foram identificadas, com uma dimensão média de 1023 pares de bases (pb), constituindo 92,2% do total do ADN genómico. A sua comparação com sequências semelhantes de genes conhecidos de outros microrganismos determinou que 577 das ORF's (55%) codificam produtos proteicos com função biológica conhecida, 177 ORF's (17 %) emparelham com proteínas de função desconhecida e 287 ORF's (28%) não se assemelham a nenhuma das sequências existentes nas bases de dados, representando, provavelmente, novos genes. Na comparação com o genoma de *Borrelia burgdorferi* (Frazer *et al.* 1997) verificou-se que 90 das ORF's de função desconhecida de *T. pallidum* subespécie *pallidum* emparelham com proteínas codificadas no cromossoma de *B. burgdorferi*, mas nenhuma emparelhou com proteínas codificadas por plasmídios, sugerindo ser essa uma característica de *Borrelia burgdorferi*.

A análise da sequência de proteínas indicou que 129 das ORFs (12%) podem ser atribuídas a 42 famílias de genes paralogos. Entre estas, 15 famílias contêm 44 genes aos quais não foi atribuída função biológica. A maior família, com 14 membros, é constituída por proteínas pertencentes ao sistema de transporte ABC. Ao contrário de muitas outras bactérias patogénicas foi demonstrado que o genoma de *T. pallidum* se encontra, aparentemente, desprovido de elementos de transposição, o que sugere não participar, activamente, em trocas genéticas.

O estudo do genoma e as funções atribuíveis às proteínas permitiu estabelecer alguma compreensão das características genéticas, metabólicas, estruturais e patogénicas deste microrganismo que se resumem:

Características metabólicas

Uma das características mais interessantes no genoma de *T. pallidum* é a sua relativa pobreza em genes envolvidos na bio-síntese de nutrientes e na produção de energia. O genoma contém um grupo de genes homólogos que se sabe serem responsáveis pelos processos básicos de vida, como a replicação de ADN, a sua transcrição e translação. Contudo, a via de síntese do ATP está, aparentemente, limitada à via glicolítica, não existindo genes reconhecidos para o ciclo do ácido tricarboxílico e cadeia de transporte de electrões (Fraser *et al.*

1998, Norris e Weinstock 2000). *T. pallidum* necessita, apenas, de quantidades limitadas de oxigênio para a sua sobrevivência e multiplicação, parecendo possuir um mecanismo ainda não identificado para a utilização do mesmo na produção de energia ou em outros processos biológicos. O gene, origem da enzima oxidase nicotinamida adenina dinucleótido, é capaz de utilizar O₂ como substrato, convertendo o NADH em O₂, NAD⁺ e H₂O e podendo assim contrariar os efeitos tóxicos do oxigênio, do mesmo modo que foi demonstrado para *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* (Stanton *et al.* 1999), agente da disenteria do porco.

Os mecanismos bio-sintéticos necessários para a síntese da maioria dos nutrientes, estão ausentes neste microrganismo, pelo que *T. pallidum* retira esses nutrientes do hospedeiro utilizando proteínas de transporte (Norris e Weinstock 2000).

Características estruturais

De particular interesse, e objecto de muitos estudos, tem sido a pesquisa sobre as proteínas expostas à superfície, sobretudo com o objectivo de desenvolver vacinas.

O conhecimento do genoma permitiu a Weinstock *et al.* (1998) evidenciar 31 proteínas que poderiam encontrar-se expostas na superfície. Contudo, Radolf *et al.* (1999a) apenas identificaram duas proteínas, com sequências semelhantes a proteínas de membrana conhecidas. Por outro lado, muitas das lipoproteínas e outros produtos de membrana, previamente, identificadas parecem encontrar-se, predominantemente, associados com a membrana citoplasmática. A identificação definitiva das proteínas de membrana externa tem sido particularmente difícil, devido à fragilidade da mesma e à sua aparente pobreza em proteínas. Blanco *et al.* (1994 e 1995) tinham identificado duas proteínas nomeadas Tromp1 e 2 (raras proteínas de membrana), considerando a primeira como tendo função de porina. No entanto, a sua localização é, ainda, assunto de controvérsia, visto outros investigadores (Hardman *et al.* 1997 e Akins *et al.* 1997) terem observado que a mesma proteína apresenta grande homologia com proteínas de transporte localizadas no espaço periplasmático, sendo esta

evidência reforçada pela localização do gene da mesma num operão de transporte (Hardman *et al.* 1997). A mesma controvérsia aplica-se à proteína enzimática glicerofosfodiesterase (GlpQ), a qual foi identificada como possível proteína de superfície por Cameron *et al.* (1998, 1999). Estes autores induziram anticorpos opsónicos e protecção parcial à inoculação de *T. pallidum* em coelho imunizado, enquanto que Shevchenko *et al.* (1999) determinaram a sua localização no espaço periplasmático, não tendo induzido imunoprotecção.

Características de virulência

Para que um microrganismo sobreviva no hospedeiro necessita de factores de virulência ou de protecção que lhe são conferidos pelos seus genes. Esses genes devem codificar proteínas intracelulares essenciais à vida, como por exemplo, as necessárias para a replicação e expressão de genes, para o metabolismo celular nas diferentes condições ambientais do hospedeiro, as reguladoras, as de transporte e as que interagem com o hospedeiro. Estas últimas conferem o fenótipo patogénico, permitindo ao microrganismo aderir aos tecidos do hospedeiro, desencadear a invasão tecidual, e evadir-se aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Weinstock *et al.* (1998) identificaram 67 genes em *T. pallidum* que podem estar relacionados com a sua patogénese. Nestes incluem-se os genes *tpr*, os genes que codificam hemolisinas, as proteínas reguladoras, as proteínas para a bio-síntese de polissacarídeos e possíveis proteínas de superfície.

Entre estes genes, os que se apresentaram como mais surpreendentes e interessantes são os que constituem uma família multigénica, de 12 genes relacionados, que codificam produtos proteicos semelhantes à maior proteína de membrana Msp de *Treponema denticola* (Haapasalo *et al.* 1992), os quais foram designados *Treponema pallidum repeat* – *tpr* A – L (Figura 3). Este foi o único microrganismo que apresentou semelhança com os 12 produtos dos genes *tpr*, quando feita a comparação nas bases de dados genómicos. A Msp de *Treponema denticola* é muito imunogénica e apresenta arranjo hexagonal na superfície externa da bactéria, pensando-se que tem actividade de porina (Fenno *et al.* 1996 e 1997, Mathers *et al.* 1996). Embora não se tenha observado

o mesmo tipo de organização das proteínas Tpr na superfície de *T. pallidum*, tem-se especulado que, pelo menos, alguns produtos proteicos dos genes *tpr* poderiam localizar-se na superfície da bactéria, podendo funcionar como porinas e ou adesinas (Weinstock *et al.* 1998). O número e a variabilidade das proteínas Tpr (Figura 4), levanta a hipótese de que elas poderão constituir um sistema de variação antigénica, representando um mecanismo de evasão imune, quer pela expressão alternativa de diferentes genes *tpr*, quer por recombinação entre eles, podendo também contribuir para a natureza recidivante da sífilis (Radolf *et al.* 1999a).

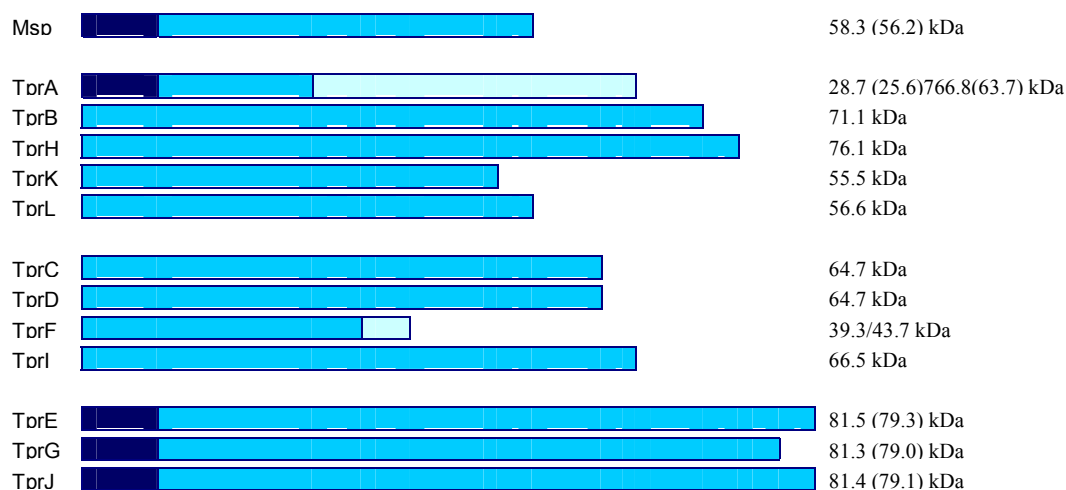


Figura 4. Grupo de proteínas de repetição (Tpr) de *T. pallidum*, agrupadas em subgrupos proteicos com sequências relacionadas e comparadas com a proteína de membrana de *Treponema denticola* (adaptado de Radolf *et al.* 1999a).

Muitas bactérias patogénicas segregam toxinas que destroem mecanismos imunes do hospedeiro ou degradam proteínas, promovendo a invasão celular. *T. pallidum* é, em geral, considerado um microrganismo não toxigénico, pois não produz LPS ou exotoxinas. No entanto, foram identificados genes que codificam cinco proteínas semelhantes a hemolisinas ou citotoxinas, sendo, ainda, necessário determinar se os produtos desses genes têm actividade lítica ou citotóxica (Weinstock *et al.* 1998). *T. pallidum* também carece de um sistema óbvio para secreção de proteínas, o qual está presente em bactérias que segregam factores de virulência.

2.3.3. Características culturais

Treponema pallidum subespécie *pallidum* é um microrganismo fastidioso de cultura difícil. Até hoje não foi possível cultivar continuamente nenhuma das suas estirpes em meios de cultura artificiais, sendo, geralmente, propagado “in vivo” por inoculação em modelo animal de laboratório.

Nos estudos experimentais utiliza-se a estirpe de Nichols, de *T. pallidum*, isolada de uma amostra de liquor de um doente com neurosífilis (Nichols e Hough 1913 citado por Norris *et al.* 2001) em 1912.

Diversos animais de laboratório têm sido utilizados para a propagação deste microrganismo. O coelho é o mais utilizado, porque nele a infecção desenvolve-se à semelhança da infecção humana, em estádios primário e latente, embora sem manifestações de secundarismo ou de fase terciária. O cobaia e o hamster são animais menos susceptíveis à infecção, e sem desenvolvimento de ulceração após inoculação de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, enquanto que outros primatas, que não o homem, embora susceptíveis, apresentam manifestações muito variadas (Turner e Hollander 1957), o que em conjunto com o seu alto custo torna pouco prática a sua utilização.

A taxa de multiplicação de *T. pallidum* “in vivo” foi determinada por quantificação sequencial de *T. pallidum* em tecido de coelho infectado e pela correlação da dose infecciosa com o tempo de desenvolvimento da lesão. A taxa de divisão é lenta, sendo o tempo de duplicação cerca de 30 a 33 horas (Magnuson *et al.* 1948 e Cumberland e Turner 1949 citados por Norris *et al.* 2001). Por outro lado, estudos efectuados em voluntários humanos por Magnuson e seus colaboradores (1956, citado por Norris *et al.* 2001) determinaram que 57 microrganismos correspondem à dose infecciosa humana, e 23 à do coelho, quando utilizado o mesmo tipo de inóculo.

Várias tentativas foram feitas para a propagação de *T. pallidum* “in vitro”. Este microrganismo é muito sensível às condições do meio, como a temperatura, o oxigénio e o pH, assim como a agentes físicos e químicos, tendo os elementos chave para a sua multiplicação “in vitro” sido descritos por Fieldsteel (Fieldsteel *et al.* 1981). A sua cultura foi obtida em presença de células de mamíferos em monocamada, como as células SF1Ep (“cotton tail rabbit epithelial”) e RAB-9

(fibroblastos de coelho) em condições de micro-aerofilia e temperatura de 34 – 35° C (Cox *et al.* 1990 e 1994). Após um período de incubação de 36 a 48 horas *T. pallidum* multiplica-se, duplicando em 35 a 40 horas, mas essa multiplicação cessa após 10 a 12 dias, não tendo sido possível manter a multiplicação “in vitro” por mais tempo. Cox *et al.* (1994) efectuaram experiências de cultura “in vitro” com duas a três passagens seriadas, mas os resultados não se apresentaram reprodutíveis nas várias experiências. A sequenciação do genoma, documentando as diversas deficiências metabólicas, veio reforçar a ideia de que a grande dificuldade em efectuar a cultura “in vitro” deste microrganismo resulta da ausência de um ou mais nutrientes especiais na preparação do meio de cultura. Infelizmente, a descoberta do ou dos nutrientes em falta não é fácil, visto serem inúmeras as possibilidades que advêm do estudo efectuado pela sequenciação e o facto de, eventualmente, terem já sido experimentados todos os possíveis suplementos nutricionais.

3. Patogénese

T. pallidum penetra no organismo através das superfícies mucosas intactas ou por lesões microscópicas na superfície de continuidade da pele. Antes do início das manifestações clínicas, a bactéria inicia a sua multiplicação local, após o que dissemina pelos vasos sanguíneos e pelos linfáticos como esquematizado na Figura 5 (Tramont 1995b).

T. pallidum é caracterizado pela sua alta capacidade de invasão e baixa toxicidade. Essa capacidade de disseminação e colonização persistentes resultam da sua mobilidade característica em saca-rolhas, da sua disseminação hematogénea, aderência e penetração das camadas de células epiteliais e de outras barreiras do hospedeiro, assim como da sua capacidade em evadir-se ao sistema imunitário (Norris *et al.* 2001).

Muita da informação sobre a patogénese da infecção resultou da investigação no modelo experimental animal, já que a informação obtida em estudos efectuados em humanos é limitada. Os estudos da inoculação experimental intra-cutânea no coelho efectuados por Magnuson *et al.* (1948 - citado por

Norris *et al.* 2001) demonstraram que a inoculação de um microrganismo é suficiente para que se produza a lesão típica. Utilizando microscopia de fundo escuro, *T. pallidum* foi visível em 47% das úlceras, aumentando essa percentagem de 71 a 100% quando inoculados 20 e 200.000 microrganismos, respectivamente. No mesmo estudo, demonstrou-se que o período de incubação variava em função do número de microrganismos presentes no inóculo, sendo que a inoculação de 10^7 microrganismos resultava no aparecimento de úlcera em cinco a sete dias.

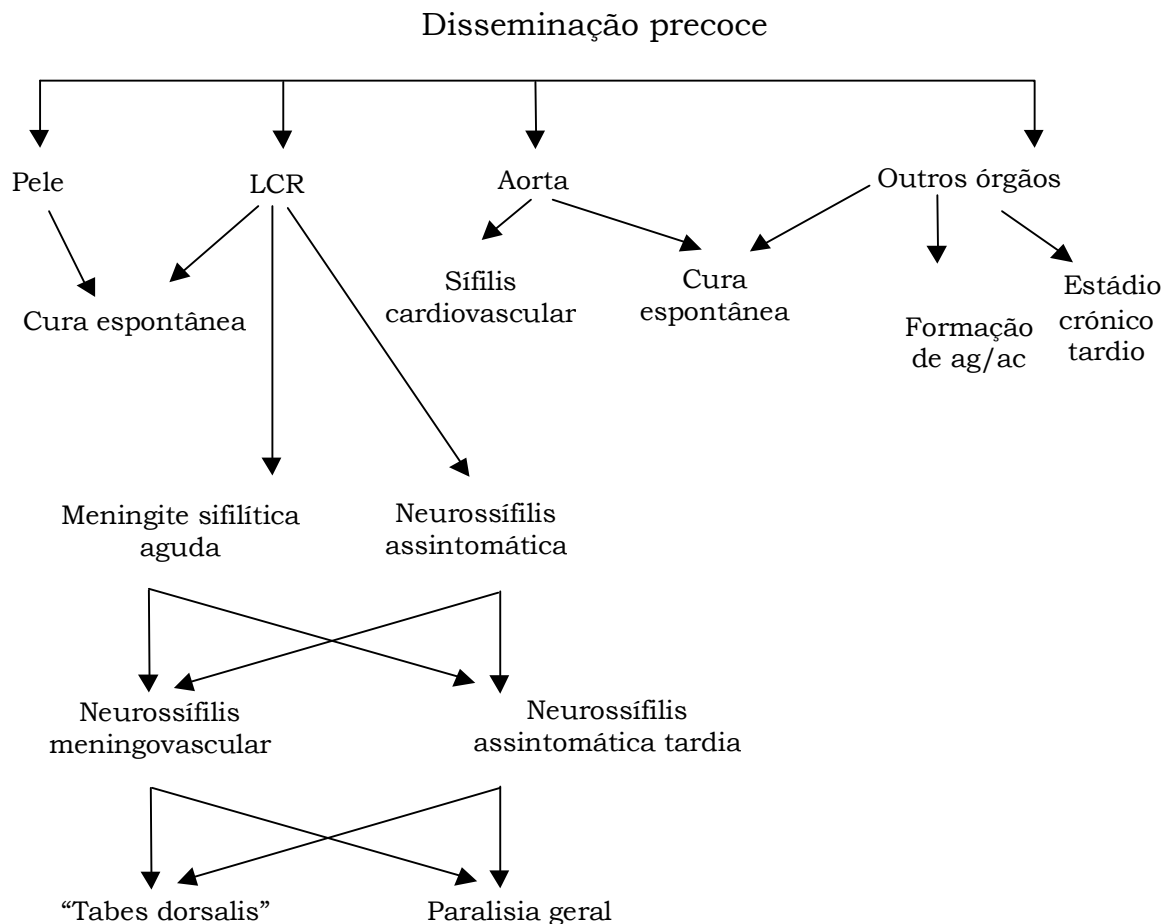


Figura 5. Disseminação e espiroquetemia após infecção por *T. pallidum*

Ag/Ac = Antígeno/anticorpo. (Adaptado de Tramont 1995a).

Embora o mecanismo exacto de entrada de *T. pallidum* nas células não esteja perfeitamente esclarecido, alguns investigadores concluíram que este microrganismo se liga às células dos mamíferos (Fitzgerald *et al.* 1975), o que parece estar relacionado com factores específicos de ligação (Baseman e Hayes 1980, Thomas *et al.* 1975). A invasão é um factor de virulência importante em *T. pallidum*, tal como foi demonstrado pela sua capacidade de penetrar células endoteliais em monocamada e em membranas intactas (Thomas *et al.* 1988, Riviere *et al.* 1989). A rápida disseminação, em horas, de *T. pallidum* foi comprovada em estudos efectuados em modelos animais por Cumberland e Turner (1949 – citado por Norris *et al.* 2001). Por outro lado, a penetração interjuncional do endotélio vascular parece ser o mecanismo pelo qual o microrganismo atinge os diversos tecidos do hospedeiro após a disseminação hematogénea (Salazar *et al.* 2002).

Os estudos efectuados “in vitro” têm sugerido que a activação das células endoteliais, quando atravessadas pelos treponemas, resulta numa nova expressão de moléculas de adesão a leucócitos envolvidas no recrutamento de células fagocitárias responsáveis pela eliminação do microrganismo (Riley *et al.* 1992).

Todas as lesões sifilíticas, qualquer que seja o estágio da doença, apresentam infiltrados celulares compostos de linfócitos, macrófagos e células plasmáticas, que associados às alterações vasculares se correlacionam com a disfunção do órgão atingido (McBroom *et al.* 1999). A presença frequente de granulomatose sublinha a importância dos mecanismos da imunidade celular em resposta à invasão pelo microrganismo, a qual no caso da presença de gomas assume um carácter necrótico, parecendo representar um exagero da resposta de hipersensibilidade tardia aos antígenos treponémicos.

Respostas do sistema imunitário à infecção por *Treponema pallidum*

A resposta à infecção sifilítica por parte do sistema imunitário do hospedeiro envolve mecanismos humorais e celulares.

A resposta humoral à infecção por *T. pallidum* é evidenciada pela presença de anticorpos reactivos a antígenos treponémicos, cujo grau de reactividade é em regra proporcional à duração do quadro clínico. No que se refere à resposta

celular, esta é claramente evidenciada pelas alterações histológicas que caracterizam as lesões sífilíticas (Salazar *et al.* 2002).

No decurso da infecção sífilítica são produzidos anticorpos, sobretudo imunoglobulinas de tipo IgG, com excepção da sífilis primária recente, em que predominam as imunoglobulinas de tipo IgM. Os padrões de reactividade antigénica têm sido observados por estudos em imunoblots, considerando-se como antigénios treponémicos dominantes as lipoproteínas treponémicas com massas moleculares de 47 kDa, 37 kDa, 35 kDa, 33 kDa, 30 kDa, 17 kDa e 15 kDa (Radolf *et al.* 1988, 1995). Os anticorpos produzidos durante a infecção são dirigidos contra os antigénios de superfície, como foi demonstrado por estudos utilizando microrganismos móveis. Disso são exemplos a imobilização de *T. pallidum* por soro humano sífilítico na presença de complemento (Bishop e Miller 1976), o aumento “in vitro” da fagocitose de *T. pallidum* por macrófagos, na presença de soro imune de coelho (Lukehart e Miller 1978), e o bloqueio da ligação de *T. pallidum* às células eucarióticas pelo soro de doente com sífilis (Hayes *et al.* 1977). A demonstração por microscopia electrónica de agregados de partículas na membrana externa dos treponemas incubados com soro imune sífilítico (Blanco *et al.* 1986) parece validar a hipótese destes anticorpos interagirem com os antigénios expostos na superfície treponémica.

Como foi já referido, as alterações histológicas que caracterizam as lesões sífilíticas no homem ou no animal evidenciam uma resposta do sistema imune celular à infecção por *T. pallidum* mesmo na sífilis recente. Lukehart *et al.* (1980) na infecção experimental do coelho observaram linfócitos reactivos a *T. pallidum* no baço, três a seis dias após a inoculação, e uma reacção proliferativa específica ao antigénio que se iniciou ao 10º dia e se prolongou até dois anos. O tempo de desenvolvimento desta resposta celular específica correlacionou-se com a progressão da infiltração com células mononucleares no local primário da infecção. A resposta celular às fracções das proteínas de *T. pallidum* de 37 e 30 kDa de massa molecular tornaram-se evidentes ao sexto dia, enquanto que as respostas às fracções proteicas de 35, 33 e 14 kDa foram detectadas ao 10º dia, tendo as respostas sido mantidas durante sete meses de observação.

No hospedeiro humano infectado as células reactivas a *T. pallidum* surgem, no sangue periférico durante a fase de sífilis primária com aumento durante o

estádio secundário (Salazar *et al.* 2002).

Na infecção por *T. pallidum* existe, também, um processo inflamatório tecidual, o qual parece fundamental na progressão da doença (formação da lesão) e na fase de desaparecimento bacteriano (resolução da lesão), sendo a presença de treponemas nos tecidos o factor que leva à activação das células imunitárias locais e ao seu recrutamento a partir do sangue periférico. As lipoproteínas da membrana de *T. pallidum*, para além de serem o factor mais imunogénico deste microrganismo (Radolf 1995), possuem também propriedades pró-inflamatórias através dos receptores “*toll-like*” (TLR2) do sistema imune inato (Lien *et al.* 1999, Brightbill *et al.* 1999).

As lipoproteínas treponémicas interagem com os receptores “*pattern recognition receptores*”-PRRs, da superfície dos monócitos e macrófagos, induzindo resposta inflamatória. Sellati *et al.* (2001) num estudo experimental com injeção intra-dérmica das lipoproteínas de 17 e 47 kDa de *T. pallidum* observaram uma resposta inflamatória importante dependente da dose injectada, com a presença de monócitos, macrófagos, células dentríticas e linfócitos T fenótipo Th1. Assim, demonstraram, que as lipoproteínas treponémicas têm a capacidade de induzir inflamação, semelhante à observada nas lesões sífilíticas do estágio de sífilis primária, pela presença de um infiltrado celular capaz de criar uma ponte entre o sistema imune inato e o adquirido.

Alguns investigadores demonstraram, quer por técnicas imunocitoquímicas, quer pela técnica da reacção em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction” -PCR), a presença de componentes do sistema imune adquirido nas lesões da sífilis primária e da sífilis secundária. McBroom *et al.* (1999) demonstraram existir predomínio de macrófagos nas lesões de secundarismo, enquanto que a análise dos subgrupos das células T presentes indicou uma relativa proporção de células CD4 e CD8, com predomínio de células CD4 na úlcera e de CD8 nas lesões de secundarismo (Tosca *et al.* 1988, McBroom *et al.* 1999).

Por outro lado, foi observado que as células que infiltram as lesões primárias e secundárias contêm ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) para indução de citocinas Th1, interleucina 2 (IL-2), gama interferão (INF γ) e interleucina 12 (IL-12) (Van Voorhis *et al.* 1996), o que foi também demonstrado no modelo

experimental animal (Arroll *et al.* 1999). Estes estudos permitem ter uma ideia do que é a complexa resposta local do sistema imune adquirido, permanecendo ainda muito por esclarecer relativamente aos imunofenotipos e especificidades antigénicas das células T presentes nos infiltrados celulares das lesões sífilíticas.

Com base nestes estudos Salazar *et al.* (2002) propõem uma estrutura que possa explicar a resposta imunitária celular à infecção por *T. pallidum*, que integra respostas imunes inata e adquiridas. Assim, quando há infecção o mecanismo imune inato será activado pelas lipoproteínas treponémicas em todos os tecidos que se encontrem infectados e em todos os estádios. Este efeito das lipoproteínas pode explicar as características histopatológicas das lesões sífilíticas e o predomínio dos macrófagos. Sobreposta a essa activação pró-inflamatória existe uma resposta do sistema imune adquirido específica de *T. pallidum*.

No decurso do estágio de sífilis recente quando se desenvolve o acidente primário sífilítico, surge uma resposta imune primária. As células T de memória não se encontram sensibilizadas para os antígenos treponémicos, de modo que as células apresentadoras de antígeno vão ser atraídas ao local da inflamação, mobilizando-se de seguida para os gânglios linfáticos, com a finalidade de processarem a apresentação do antígeno às células T nativas. As células T sensibilizadas deslocam-se para a úlcera genital, acelerando a eliminação bacteriana local, com subsequente cura do acidente primário sífilítico. No subsequente estágio de generalização, as células T sensibilizadas em conjunto com os anticorpos opsonicos, vão permitir uma resposta imunológica mais eficaz. Com a progressiva sensibilização das células T, a resposta imunitária do hospedeiro aumenta, as recidivas tornam-se menos frequentes e a doença progride para a fase de sífilis tardia, em que, aproximadamente 75% dos doentes entram em fase de latência clínica. À medida que decorre o tempo, esta função de “vigilância” irá diminuir e o hospedeiro poderá então apresentar recrudescência da doença (Salazar *et al.* 2002).

4. Epidemiologia e transmissão

A epidemiologia é a disciplina que estuda as determinantes das doenças na população humana (Last 1988) e a sua distribuição, sendo um dos seus propósitos a análise da origem de um surto epidémico.

A sífilis é uma infecção sexualmente transmitida com distribuição mundial. Contudo, as taxas de incidência são maiores nos países em desenvolvimento (Greenwood *et al.* 1992, Piot e Meheus 1986, Pham-Kanter *et al.* 1996), quando comparadas com as dos países industrializados. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) de 1996, estima-se que existam em todo o mundo cerca de 12 milhões de novos casos, ocorrendo a maior parte nos países em desenvolvimento (Gerbase 1998a, 1998b), nos quais cerca de 10% da população pode estar infectada. Maior número de novas infecções ocorre nas regiões da Ásia do Sul e África Subsaariana (quatro milhões cada região) e América Latina e Caraíbas (três milhões).

No que se refere aos chamados países desenvolvidos as flutuações das taxas de incidência foram semelhantes. Após a diminuição devida à utilização da penicilina, surge um aumento da incidência nos anos 60, entre toda a população sexualmente activa, relacionada com a revolução sexual, e nos anos 70 entre os homossexuais masculinos, associada com a liberalização das atitudes relativamente ao comportamento homossexual. É a epidemia da SIDA que, gerando alteração dos comportamentos de risco vem a contribuir para a dramática redução dos casos de sífilis nos anos 80.

Na Europa Ocidental, nomeadamente no Reino Unido, verificou-se duplicação dos casos entre 1998 e 2000 em ambos os sexos, tendo sido observado um aumento de 172 casos para 372 no sexo masculino e de 102 para 156 no sexo feminino, devido ao aparecimento de alguns surtos de sífilis em diferentes áreas geográficas do país (Communicable Disease Surveillance Centre 1998 e 2000, Higgins *et al.* 2000, Doherty *et al.* 2002). No que se refere à Europa de Leste, presenciou-se aumento das taxas de incidência da sífilis primária e da sífilis secundária desde a “queda do muro de Berlim” em 1990 (Tichonova *et al.* 1997). Surtos epidémicos da infecção por *T. pallidum* foram também observados nos Países Bálticos, Ucrânia e países da Ásia Central (Borisenko *et al.* 1999 e

Kastanova 1995). Neste caso, os surtos epidémicos parecem relacionados com as alterações políticas e económicas que geraram grandes diferenças salariais, aumento do desemprego sobretudo entre o sexo feminino (Renton *et al.* 1998), com aumento de prostituição e de migração entre as diversas regiões e estados. Desde o final da década de cinquenta até 1980, a sífilis e as outras infecções sexualmente transmissíveis pareciam ter sido erradicadas na República Popular da China (Cohen *et al.* 1998). No entanto, com a abertura da China em 1980 aos visitantes do ocidente, a incidência das infecções sexualmente transmissíveis e da sífilis aumentou novamente (Rompalo 2001a).

Tal como nos outros países desenvolvidos as taxas de incidência da sífilis nos Estados Unidos eram elevadas durante a II guerra mundial com um pico de 76 casos/100.000 habitantes em 1947. Com a introdução da penicilina e com os esforços dos Serviços de Saúde Públicos, observa-se diminuição para cerca de quatro casos/100.000 habitantes no final dos anos 50. Após esta quase eliminação dos casos de sífilis pelos finais dos anos cinquenta e até aos dias de hoje, observaram-se períodos cíclicos de epidemias de sífilis, os quais se relacionam, sobretudo, com fases de alterações no comportamento sexual, como a generalização da utilização da pílula nos anos 60, generalização das casas de banhos públicas para homossexuais, nos anos 70 e 80 e uso de *crack*-cocaína nos anos 90 (Brandt 1988, Finelli *et al.* 1993). É no entanto, de referir que apesar de se ter observado, na sequência desses surtos, um declínio na incidência da infecção (CDC 2002c), nos últimos anos observou-se um aumento da mesma devido a surtos epidémicos surgidos entre os homossexuais masculinos co-infectados com o vírus VIH (CDC 2002b, Chen *et al.* 2002, CDC 2003)

Embora não existam números exactos sobre a incidência de sífilis nos países em desenvolvimento, estudos com base na pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* na população mostram uma seroprevalência muito variada que pode ir de 0,9% a 94% dependendo do grupo populacional estudado (WHO 1995). A OMS estimou em cerca de 12 milhões de novos casos de sífilis no adulto, ocorrendo na Ásia do Sul e Sudoeste, com 5,8 milhões de casos, enquanto que na África Subsahariana ocorreriam 3,5 milhões (WHO 1995). Os factores de risco associados a essa alta prevalência de sífilis incluem profissões como condutores

a longa distância e trabalhadoras de lojas de sexo, assim como a presença de outras infecções sexualmente transmissíveis e o baixo nível educacional e socio-económico (Newell *et al.* 1993, WHO 1995). Em África, os condutores a longa distância foram avaliados, apresentando taxas de infecção sífilítica de cerca de 15%, enquanto as prostitutas apresentam taxas entre 23 a 47% no Norte de África e no Médio Oriente (WHO 1995). Em países como a Tailândia e o Zimbabué foi observada diminuição nas taxas de incidência, embora sejam, ainda, muito elevadas (Piot e Islam 1994, Kunawararak *et al.* 1995). Na Tailândia, esse declínio foi atribuído às campanhas governamentais de prevenção e controlo, com aumento de utilização de preservativo e disseminação do recurso aos antibióticos (Kunawararak *et al.* 1995).

Relativamente à situação em Portugal, como não existe um programa de vigilância, prevenção e controlo de infecções sexualmente transmissíveis, obtiveram-se alguns dados a partir do Boletim Informativo da Eurotrials (2001) e dos dados disponíveis na Direcção Geral de Saúde em Estatísticas e Doenças de Declaração Obrigatória.

A publicação da Eurotrials apresenta dados de 1987 a 1998, nos quais é possível verificar que se registou diminuição progressiva na incidência de sífilis na União Europeia de cerca de 3,5/100000 habitantes em 1987 para 1,5/100000 em 1998. Em Portugal, com taxas de incidência mais elevadas que a média europeia, observa-se maior descida entre 1987 (4,5/100000) e 1990 (2/100000) e valores de 2,37/100000 em 1997 e de 1,8/100000 em 1998. Em relação ao ano de 1998, as maiores taxas de incidência foram observadas no Algarve (Faro) e no Alentejo (Portalegre) com valores superiores a 3/100000, seguidas da região Litoral Centro, Litoral Alentejano e Litoral Douro, com taxas de incidência entre 2 e 2,9 por 100000 habitantes.

No gráfico da Figura 6 encontram-se os dados obtidos a partir das estatísticas das Doenças de Declaração Obrigatória (DGS - 2002 e 2003), relativamente ao número de casos notificados, distribuídos por regiões de Portugal e anos, enquanto que no gráfico da Figura 7 se encontram os mesmos dados relacionando a distribuição etária, por ano e por sexo.

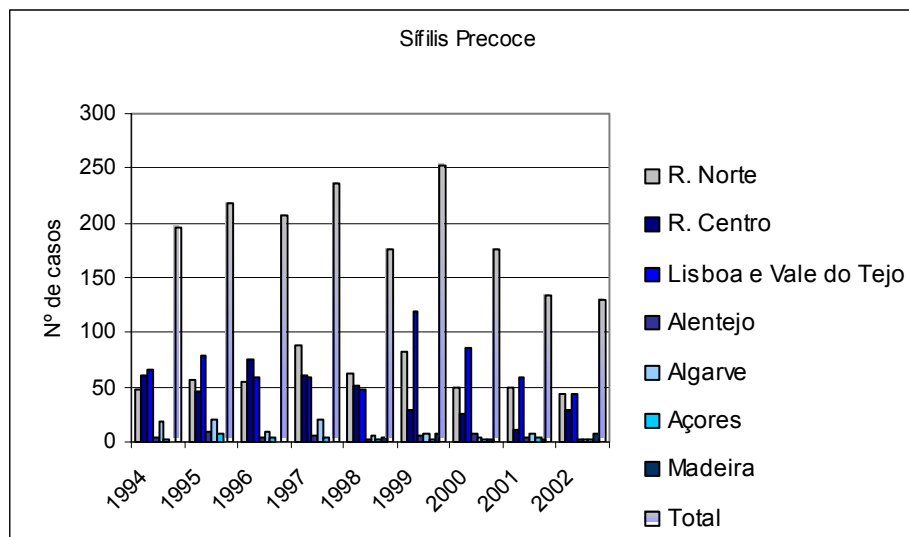


Figura 6. Distribuição de sífilis precoce por zona geográfica (dados estatísticos das doenças de declaração obrigatória - Direcção Geral de Saúde)

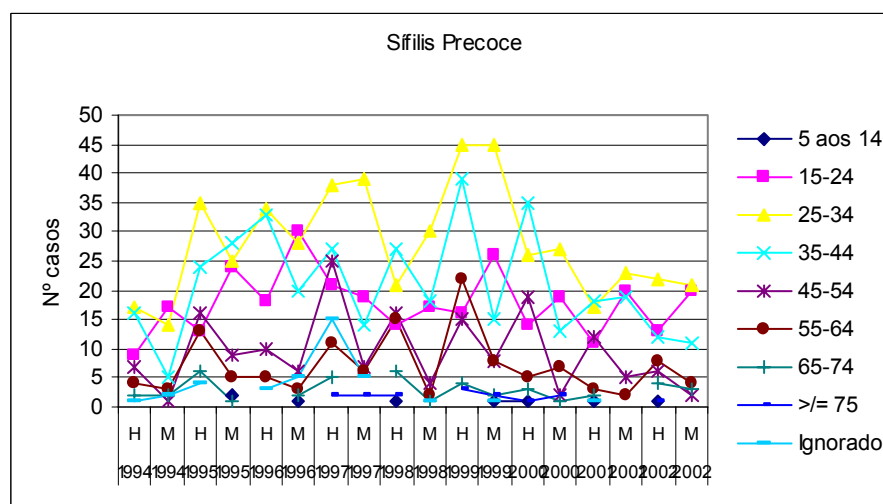


Figura 7. Distribuição de sífilis precoce por grupo etário e por sexo (dados estatísticos das doenças de declaração obrigatória - Direcção Geral de Saúde)

No entanto, não é possível qualquer tipo de comparação entre uns dados e os outros, uma vez que os da Eurotrends se referem a taxas de incidência, enquanto que os da Direcção Geral de Saúde se referem ao número de casos

notificados. No entanto, parece que estes dados estarão subestimados, pois como não existe um centro de controlo e vigilância de infeções sexualmente transmissíveis, nem um programa de prevenção e controlo, muitos casos ficam por diagnosticar e notificar. Alguns serviços de Dermatologia e Venereologia constituíram uma rede de vigilância de Infeções Sexualmente Transmissíveis (IST), com a finalidade de obter dados mais exactos sobre a prevalência destas infeções. Segundo os dados da consulta de Doenças Sexualmente Transmitidas (DST) no Centro de Saúde da Lapa e apresentados no congresso de Dermatologia e Venereologia em Coimbra no ano de 2002, fizeram parte dessa rede catorze serviços no ano de 2000, os quais diminuíram para sete em 2001. Nesses dois anos foram notificados 1927 doentes (1091 em 2000 e 836 em 2001) e 2207 infeções sexualmente transmissíveis, das quais 581 (30,1%) foram de sífilis recente e sífilis latente indeterminada. Mesmo com base nestes números e embora referentes a anos diferentes, é possível observar a grande diferença existente entre os números oficiais e estes, que só por si não representam, no entanto, o País.

A sífilis é usualmente adquirida por contacto sexual, com excepção dos casos de sífilis congénita em que a criança adquire a infecção “in útero” (Sparling 1999). A transmissão sexual requer contacto com as lesões húmidas, cutâneas ou mucosas, pelo que um indivíduo só transmitirá a infecção durante os primeiros anos, enquanto existe probabilidade de recidiva espontânea das lesões cutâneo-mucosas de secundarismo. A taxa de aquisição de infecção por contacto sexual foi estimada entre nove e 63%, tendo como base estudos sobre eficácia de vários antibióticos em prevenirem a infecção (Moore *et al.* 1963, Schoeter *et al.* 1971), enquanto que os resultados de estudos com base na notificação de parceiros estimaram a taxa de transmissão de sífilis recente de 18 a 80% (Schober *et al.* 1983, Schrijvers *et al.* 1989). As discrepâncias e os limites desses estudos foram discutidos por Garnett *et al.* (1997), que concluíram haver alta probabilidade de transmissão da infecção a *T. pallidum* durante contacto sexual entre indivíduo susceptível e indivíduo infeccioso, a qual se situaria em redor dos 60%, em contradição com Sparling (1999) que refere que aproximadamente 30% dos indivíduos com contacto sexual com outros, com lesões activas da pele

ou das mucosas irão desenvolver sífilis.

A sífilis pode ainda ser transmitida por contactos como o beijo ou o toque de lesões activas, como sucedia na época em que as amas de leite disseminavam a infecção às crianças que amamentavam (Tratmont 1990)

O risco de transmissão sanguínea é actualmente negligenciável, devido à selecção dos dadores de sangue, para os quais é obrigatória a pesquisa de anticorpos para a sífilis e ao tipo de transfusão que, de sangue fresco passou a ser de componentes sanguíneos refrigerados (Willcox e Guthe 1966). Apesar disso é possível, pelo menos teoricamente, a transmissão via produtos sanguíneos, uma vez que os microrganismos podem sobreviver até cinco dias em sangue refrigerado (Van der Sluis *et al.* 1984 e 1985).

A transmissão por partilha de seringas entre toxicodependentes injectáveis em fase de espiroquetémia seria possível, mas, provavelmente, não tem papel significativo. É, no entanto, um assunto sobre o qual quase não existem estudos (Singh e Romanowski 1999). A transmissão não sexual presumida resultante de lesões nas mãos foi descrita em trabalhadores de saúde antes da utilização de luvas por rotina e em crianças partilhando a cama com pessoas infectadas (Singh e Romanowski 1999).

5. História natural da doença e manifestações clínicas

5.1. História natural da doença

As manifestações clínicas da sífilis são conhecidas desde há muito, mas a descrição da sua história natural tem origem em estudos realizados no início do século passado.

O primeiro, o estudo de Oslo, iniciado em 1891 por Boeck, incluiu 1978 doentes com sífilis recente com diagnóstico apenas baseado em critérios clínicos, pois na altura não existia microscopia de fundo escuro nem testes serológicos disponíveis (Sparling 1999). Boeck iniciou o estudo por estar preocupado com o facto da terapêutica em uso na época (mercuriais) parecer mais tóxica que a própria doença. Assim, seleccionou doentes com sífilis primária e sífilis

secundária que apresentando lesões, eram internados, não sendo tratados. Os doentes foram seguidos por Boeck até 1910 depois por Brusgaard e mais tarde, de 1949 a 1951, por Gjestland que monitorizou 1404 desses doentes (Gjestland 1955 - citado por Sparling 1999). Os dados revistos em 1955 foram re-analisados em 1964 por Clark e Danbolt (Clark e Danbolt 1955 e 1964 - citados por Sparling 1999). Os resultados obtidos indicaram que, aproximadamente, um terço dos doentes desenvolveu manifestações terciárias neurológicas, cardiovasculares e gomas e que a probabilidade de morrer devido a sífilis não tratada era de 17% no homem e de 8% nas mulheres.

A manifestação tardia mais frequente foi a goma, ocorrendo em 14% dos homens e 17% das mulheres, surgindo um a 46 anos após a cura das lesões iniciais.

A incidência de sífilis cardiovascular clinicamente aparente foi de 13,6% nos homens e 7,6% nas mulheres, tendo aparecido após 30 a 40 anos de evolução da doença, enquanto que a neurosífilis se desenvolveu em 9,4% dos homens e 5% das mulheres. Destes casos de neurosífilis a forma meningovascular aparece entre os 15 a 18 anos de evolução, a paralisia geral entre os 20 e os 25 anos e a “tabes dorsalis” mais tardiamente, após cerca de 30 anos de evolução (Sparling 1999).

Outra investigação semelhante foi efectuada durante 40 anos no Instituto de Tuskegee em Macon, Alabama, pelos Serviços de Saúde Pública dos Estados Unidos em 1932, em homens afro-americanos com sífilis que não foram tratados.

O estudo tem sido criticado devido a ser eticamente reprovável, sobretudo por não ter sido oferecida a terapêutica com penicilina já disponível na altura. Por esta razão o presidente Clinton, em 1997, pediu desculpa aos sobreviventes e familiares dos indivíduos nele incluídos. Um total de 412 homens com sífilis latente não tratada e 204 controlos não infectados foram monitorizados. A monitorização foi feita durante cerca de 20 anos, tendo-se perdido cerca de 10% dos doentes, enquanto que dois terços tinham morrido tendo sido efectuada autópsia. A principal conclusão foi a de que existiu uma alta mortalidade sobretudo nos primeiros vinte anos de evolução. O envolvimento cardiovascular foi a complicação mais frequentemente encontrada, tendo aparecido em 50%

dos doentes infectados. Após vinte anos, a sífilis cardiovascular e a neurosífilis foram as causas primárias de morte (Sparling 1999).

Um terceiro estudo importante para a história natural da doença foi a revisão de todas as autópsias efectuadas entre 1917 e 1941, realizado por Rosahn (Rosahn 1947 citado por Sparling 1999), na Escola de Medicina da Universidade de Yale. Das 4000 autópsias de indivíduos com idades superiores a 20 anos na altura da morte, 9,7% tinham evidência clínica, laboratorial ou anátomo-patológica de sífilis, tendo apenas cerca de metade efectuado terapêutica. Na totalidade, 51% dos doentes com sífilis apresentaram na autópsia lesões típicas da infecção e 30% dos doentes com diagnóstico efectuado em vida apresentaram lesões de sífilis tardia. Entre os 77 doentes não tratados e com lesões tardias na autópsia, 83% tinham lesões cardiovasculares, 9% tinham lesões tardias benignas (goma) e 8% tinham lesões neurológicas.

Estes estudos concluíram ter havido um aumento da mortalidade devido à sífilis, e que 15 a 40% dos doentes não tratados desenvolveram complicações tardias, sendo estas sobretudo, cardiovasculares e neurológicas.

Na era pós-antibiótica, e essencialmente por razões éticas não se efectuaram mais estudos deste tipo, sendo no entanto evidente que a terapêutica com penicilina dos doentes com sífilis recente, quase sempre, previne o aparecimento das lesões tardias. Os diferentes estudos estatísticos vêm demonstrar que, pelo menos, aparentemente os antibióticos abortam o aparecimento de complicações tardias da sífilis (Sparling 1999). Gomas e paralisia geral praticamente desapareceram da cena contemporânea, embora existam alguns registos de aparecimento de sífilis tardia sobretudo em doentes co-infectados por VIH (Luxon *et al.* 1972, Hay *et al.* 1990b, Romero-Jimenez *et al.* 2003).

Embora as complicações tardias sejam agora menos frequentes do que na era pré-antibiótica é importante alertar para a possibilidade do seu aparecimento, devendo-se ter sempre presente, as múltiplas facetas da grande imitadora que é a sífilis venérea.

5.2. Manifestações clínicas

A sífilis adquirida não tratada é uma infecção crónica que progride através uma variedade de estádios clínicos, com períodos activos sintomáticos e períodos de latência sem sintomatologia, apresentando manifestações e patologia distintas.

5.2.1. Complexo primário

A inoculação de *T. pallidum* ocorre através do contacto directo da pele ou das mucosas com lesões infecciosas, sendo a taxa de aquisição de infecção estimada em cerca de 30% (Schroeter *et al.* 1971). Após o contacto, segue-se um período de incubação de cerca de três a 90 dias (em média três semanas), sem manifestações clínicas ou muito discretas (febrícula). No local da inoculação surge então uma pápula caracteristicamente não dolorosa, e que em poucos dias evolui para a lesão que caracteriza o complexo primário, o qual associa o acidente primário, linfadenite regional e espiroquetemia. A úlcera, é geralmente única, não dolorosa, de 0,5 a 1 cm de diâmetro, de base limpa e dura à palpação. Embora a úlcera solitária seja mais frequente, as lesões múltiplas também podem ocorrer (cerca de 30% dos casos), sendo mais comuns nos indivíduos com co-infecção por VIH (Musher 1999, Rompalo *et al.* 2001b). A úlcera ocorre, geralmente, nas áreas genital, perineal ou anal, embora possa localizar-se em qualquer outra parte do corpo. No homem é mais frequente no pénis, sobretudo no sulco balanoprepucial, enquanto que na mulher se localiza na vagina, sendo mais frequente no colo do útero, podendo passar despercebida. A adenopatia satélite, de localização inguinal (no caso de acidente primário genital), é em regra única, sendo dura, indolor, sem sinais inflamatórios e não aderente aos planos superficiais ou profundos.

Na ausência de tratamento, a lesão primária cicatriza espontaneamente em 10 a 14 dias, havendo também desaparecimento da adenopatia satélite.

Embora a ulceração represente a infecção local que evidencia, inicialmente a infecção por *T. pallidum*, a sífilis torna-se uma infecção sistémica praticamente desde o seu início. A disseminação dos treponemas ocorre precocemente, a

bactéria multiplica-se no local de penetração por divisão binária em cerca de 33 horas, disseminando pelos vasos linfáticos e sanguíneos (Larsen *et al.* 1998).

Trata-se de uma fase altamente infecciosa, com presença de *T. pallidum* nas lesões, e segundo Sparling (1999), aproximadamente, 30% dos contactos de um indivíduo com lesão irá desenvolver sífilis.

5.2.2. Período secundário

Semanas a meses mais tarde, 25% a 35% dos indivíduos com complexo primário sífilítico não tratado, irão desenvolver doença sistémica, evoluindo para o período secundário, não havendo, por vezes, demarcação entre os dois estádios. Em cerca de um terço dos doentes com secundarismo foi observada a presença do complexo primário, e em cerca de 60% de doentes com estágio secundário, não foi possível encontrar história clínica de sífilis primária (complexo primário), podendo esta ter passado despercebida ou ter sido assintomática (Chapel 1980).

O período secundário corresponde à generalização da infecção, com grande número de manifestações clínicas. As lesões desta fase resultam da disseminação hematogénea das espiroquetas durante a sífilis primária. Na fase inicial do secundarismo podem surgir manifestações gerais, usualmente moderadas, como febre, artralgias, anorexia, prostração, emagrecimento (Singh e Romanowski 1998), adenopatias generalizadas das cadeias ganglionares superficiais e um quadro clínico dermatológico com lesões da pele e/ou das mucosas que podem imitar outras doenças dermatológicas.

As lesões da pele, geralmente não pruriginosas, são muito variáveis, indo desde o exantema macular a maculo-papular, papular e pustuloso (Chapel 1980). As lesões papulares esbranquiçadas, geralmente designadas como condilomas planos, ocorrem em áreas húmidas como as comissuras labiais, os genitais e/ou o períneo, sendo mais frequentes em áreas próximas da lesão primária, reflectindo a disseminação directa dos microrganismos a partir do local da inoculação (Chapel 1980).

Em 5 a 22% dos doentes observam-se também lesões típicas ulcerosas das mucosas, envolvendo a língua, a mucosa labial e a mucosa bucal (Chapel

1980). Estas lesões, com cerca de 1-10 mm, são em geral, ligeiramente elevadas, não dolorosas, com erosão central coberta de uma fina membrana (Singh e Romanowski 1998). Embora possam ser lesões que desaparecem em horas ou dias, tipicamente mantêm-se durante duas a três semanas.

As áreas pilosas, embora com menos frequência, podem, também, ser atingidas, com o aparecimento de zonas de alopecia, em clareiras no couro cabeludo, barba e sobrancelhas (Chapel 1980, Mindel *et al.* 1989).

Associados às alterações do foro dermatológico, podem ocorrer manifestações clínicas como icterícia e proteinúria, relacionados com o envolvimento hepático e renal (Campisi e Whitcomb 1979, Petersen *et al.* 1983, Hunte *et al.* 1993). O estômago pode também ser afectado com erosão da mucosa ou úlceras envolvendo as áreas antral e pilórica (Winters *et al.* 1992, Greenstein *et al.* 1994).

Na sífilis secundária podem ocorrer, também, manifestações oculares, correspondendo ao processo inflamatório que inclui episclerite, queratite intersticial, iridociclite, uveíte, envolvimento do nervo óptico e anomalias da pupila (Schlaegel e Kao 1982, Spoor *et al.* 1983, Margo e Hamed 1992, Deschenes *et al.* 1992). Associado a outros sintomas de sífilis secundária, o doente pode ainda apresentar tinitus bilateral e surdez (Morrison 1992).

As manifestações neurológicas deste estágio da sífilis podem ser variáveis, e têm merecido uma maior atenção nos últimos anos, devido à relação com a concomitante infecção por VIH. Em cerca de 40% dos doentes com sífilis secundária observam-se alterações no exame citoquímico do liquor com aumento do número de leucócitos, do valor total de proteínas, teste para antígeno cardiolipina (VDRL) reactivo ou presença de *T. pallidum*, mesmo na ausência de alterações neurológicas clinicamente aparentes (Mills 1936 e Bauer 1952, citados por Musher 1999). No entanto, não mais de 1 a 2% dos doentes com sífilis secundária apresentaram sintomas ou sinais correspondendo ao envolvimento do sistema nervoso central (Musher 1999).

Dores ósseas e articulares foram referidas em cerca de 12% dos doentes, mas osteíte e artrite foram raramente descritas (Reginato 1993). A sífilis maligna ou úlcero-nodular é uma manifestação rara deste estágio, surgindo com sintomas prodrômicos de febre, mal-estar geral e mialgias, seguidos de exantema popular

que progride para pústulas com centros necróticos ulcerados (Fisher *et al.* 1969). A associação com a infecção VIH tem sido sugerida, já que onze dos doze casos referenciados desde 1989 ocorreram em doentes infectados por VIH (Sands e Markus 1995).

Todos os sintomas e sinais desta fase vão diminuindo com o tempo, até a infecção se tornar silenciosa do ponto de vista das manifestações clínicas, entrando em fase de latência e progredindo, assim, de infecção aguda para crónica.

Também durante a fase de secundarismo sífilítico, o doente é altamente contagioso.

5.2.3. Sífilis latente

Mesmo sem terapêutica os sinais e sintomas da sífilis primária e do secundarismo resolvem espontaneamente, após um período de três a 12 semanas, e os doentes entram no estágio latente ou assintomático da infecção. Este é definido como o estágio da doença em que os testes treponémicos são reactivos, mas no qual não existem manifestações clínicas de sífilis, o que não significa que a doença não progrida. A fase de latência prolonga-se, até que haja cura terapêutica ou desenvolvimento de sífilis terciária.

A fase assintomática ou latente foi subdividida em fase latente precoce e fase latente tardia sendo sobretudo utilizada como guia de decisões terapêuticas. A Organização Mundial de Saúde (WHO 2001) definiu como sífilis latente precoce e potencialmente infeccioso o período de latência precoce até dois anos após o início da doença, enquanto que o mesmo para o Centers for Disease Control and Prevention (CDC 2002a) corresponde apenas ao primeiro ano de evolução da doença.

Na prática, a distinção torna-se difícil porque raramente os doentes têm testes serológicos para sífilis do ano precedente ao diagnóstico de sífilis latente, e não se lembram de sinais ou sintomas sugestivos de sífilis primária ou de sífilis secundária, passando a serem designados como de sífilis latente de duração indeterminada e devendo ser para todos os efeitos considerados como se tivessem sífilis latente tardia (CDC 1998, 2002a). Enquanto que o indivíduo

com sífilis latente precoce é considerado como infeccioso devido aos 25% que podem recidivar, o doente com sífilis latente tardia apresenta uma relativa imunidade à recidiva e um aumento de resistência à reinfecção com estirpes treponémicas homólogas (Musher 1999).

5.2.4. Sífilis tardia

A sífilis tardia (ou sífilis terciária) ocorre, aproximadamente, num terço dos doentes não tratados, provavelmente devido à diminuição da resposta imune do hospedeiro. Este estágio pode surgir entre 4 a 40 anos após a infecção inicial, na maior parte dos casos entre 15 e 25 anos (Swartz *et al.* 1999).

Os treponemas invadem principalmente a pele, o sistema nervoso central, o cardiovascular, e os ossos. A sífilis tardia pode ser definida como uma doença inflamatória de progressão lenta, que pode atingir qualquer órgão, e causar doença muitos anos após a infecção inicial. A lesão patológica subjacente resulta, primariamente, de uma endarterite obliterante das pequenas artérias, mas também, por efeito directo, em consequência da invasão, da destruição dos tecidos, sobretudo do sistema nervoso central.

Caracteristicamente e embora algum grau de sobreposição possa surgir, cerca de metade dos doentes que progridem para sífilis tardia terão goma, um quarto apresentará sífilis cardiovascular e um quarto neurosífilis (Swartz *et al.* 1999).

Sífilis cardiovascular

O envolvimento cardiovascular ocorre, em geral, entre 10 e 30 anos após primo-infecção (Swartz *et al.* 1999).

As lesões cardiovasculares são, em regra, resultantes da inflamação local induzida pela multiplicação dos treponemas no interior da parede da aorta, com endarterite obliterante dos “vasavasorum”, levando à necrose da média, com destruição do tecido elástico e subsequente aortite e aneurisma (Singh e Romanowski 1999).

Neurossífilis

O sistema nervoso central é invadido em, pelo menos, 40% dos casos no decurso da bacterémia do estágio recente (Chesney e Kemp 1924 citado por Swartz *et al.* 1999, Lukehart *et al.* 1988), e tal como sucede com o envolvimento de outros órgãos, as manifestações resultantes, do respectivo compromisso, variam de doente para doente.

A invasão inicial do sistema nervoso central pode evoluir de formas distintas, desde a remissão espontânea ou cura terapêutica, manter-se assintomática, evoluir para meningite sífilítica aguda ou crónica. A meningite crónica pode, por seu turno, ser assintomática ou progredir para padrões patológicos que classicamente constituem a neurossífilis (sífilis meningo-vascular e neurossífilis parenquimatosa). Deve ter-se sempre presente que as manifestações e a progressão da doença constituem um espectro contínuo de variações e sobreposições, pelo que é sempre necessário excluir neurossífilis antes de se considerar o diagnóstico de qualquer processo degenerativo progressivo do sistema nervoso central como a esclerose múltipla e a doença de Alzheimer.

Neurossífilis assintomática

Esta situação é definida pela presença de alterações do exame citoquímico do liquor, como um aumento no número de células 5-100/mm³ (na sua maioria linfócitos), aumento da concentração de proteínas 45-100mg/dl, diminuição na concentração de glucose e/ou teste não treponémico VDRL reactivo, na ausência de qualquer sinal ou sintoma de doença neurológica (Tramont 1995b). De considerar, também, a presença de *T. pallidum* já que pode ser o único sinal desta situação (Lukehart *et al.* 1988). Assim, o diagnóstico de neurossífilis assintomática é um diagnóstico laboratorial.

A punção lombar está recomendada para exclusão de diagnóstico de neurossífilis assintomática nos doentes com sífilis: a) que apresentem sintomas ou sinais neurológicos ou oftalmológicos; b) com evidência de sífilis terciária activa; c) com insucesso terapêutico ou com infecção por VIH em associação com sífilis latente tardia ou de duração indeterminada (CDC 2002a).

Neurossífilis sintomática

A neurossífilis sintomática pode surgir com diferentes formas, meníngea ou parenquimentosa (Swartz *et al.* 1999).

A meningite sífilítica é situação clínica que ocorre, em geral, no primeiro ano da infecção. Em cerca de um quarto desses doentes a meningite é a primeira manifestação da doença, dos quais uma pequena percentagem pode, ainda, apresentar exantema (Merrit 1935, citado por Swartz *et al.* 1999). A sintomatologia é característica da de meningite aguda (febre persistente, cefaleias moderadas e rigidez da nuca), cujas principais manifestações neurológicas incluem alterações dos pares cranianos e sinais de aumento de pressão intracraniana.

O denominador comum da sífilis meningovascular é a presença de endarterite, primeiro das médias e em seguidas das grandes artérias. Este tipo de lesão, que pode ou não progredir para enfarte cerebral, ocorre em qualquer nível do sistema nervoso central levando ao aparecimento de uma grande variedade de sinais e sintomas, tais como, cefaleias intermitentes, perda de memória, disfagia, perda de visão, alterações vestibulares, etc. A sífilis meningovascular da medula espinhal é uma manifestação rara, que quando presente quase sempre se associa com envolvimento cerebral.

A neurossífilis parenquimentosa é o reflexo da invasão directa e da destruição do tecido nervoso, sendo classicamente dividida em paralisia geral e *tabes dorsalis*. Na sua forma mais pura, a primeira está directamente relacionada com a invasão do cérebro por *T. pallidum*, tratando-se de um processo crónico lento, que evolui ao longo de muitos anos, geralmente para a morte, 15 a 25 anos após o início da infecção. Clinicamente, a paralisia geral combina sintomas neurológicos e psiquiátricos, associando-se às manifestações secundárias de sífilis meningovascular. Do ponto de vista patológico o cérebro encontra-se atrófico com degenerescência e perda de células nervosas, podendo ser demonstrada a presença de treponemas. Os vasos sanguíneos apresentam endarterite. Nesta fase, a terapêutica antibiótica pode parar mas não reverte o processo degenerativo.

A *tabes dorsalis* ocorre num terço dos doentes com neurossífilis não tratada

desenvolvendo-se, também, tardiamente na evolução da doença não tratada, cerca de 30 anos depois do início da infecção. O sintoma mais característico desta alteração neurológica é o aparecimento de dor severa penetrante, irradiante, que desaparece após alguns minutos. Geralmente, ocorre nos membros inferiores mas pode surgir em qualquer outro ponto do organismo, como por exemplo no abdômen, imitando uma urgência cirúrgica. Alterações pupilares (pupilas de Argyll Robertson) estão, quase sempre, presentes e a atrofia óptica é também comum, tal como a ausência de reflexos nos membros. Com a progressão da doença, surge degenerescência do cordão posterior da medula espinhal, que resulta em perda do sentido de posição e da sensibilidade vibratória com sinal de Romberg positivo, desenvolvimento de articulações de Charcot e/ou mal perfurante plantar. A progressão é em geral para incapacidade completa. A penicilina não reverte as extensivas lesões teciduais observadas neste estágio tardio da sífilis (Swartz *et al.* 1999).

O envolvimento ocular pode ocorrer, quer como manifestação principal (irite, uveíte, nevrite óptica), quer concomitantemente com outras manifestações, sobretudo nos estádios tardios de neurosífilis (Shin *et al.* 1976, Ross e Sutton 1980).

Uveíte anterior, irite e uveíte posterior, podem surgir durante ou logo após o período de secundarismo, apresentando os sintomas e sinais típicos de fotofobia, dor, visão desfocada e aumento do lacrimejo (Shin *et al.* 1976). A nevrite óptica é menos frequente, mas deverá ter-se em mente, visto tratar-se de uma urgência médica pelo risco de perda de visão. Estas manifestações oculares da sífilis, assim como outras alterações pupilares, tais como alterações da visão e cegueira óptica secundária a atrofia são comuns na neurosífilis tardia.

5.3. Sífilis e infecção por VIH

A co-infecção por VIH e por *T. pallidum* resulta numa doença multiforme devido à sua interacção (Tramont 1987, Hook 1989, Musher *et al.* 1990, Musher 1991,

Tramont 1995a). As duas infecções partilham algumas semelhanças, sendo que os esforços efectuados para compreender e controlar a epidemia da sífilis no século passado são semelhantes aos realizados actualmente, com o mesmo fim no que diz respeito à epidemia por VIH, os dois microrganismos compartilham os mesmos mecanismos de transmissão (sexual e sanguínea) e afectam o mesmo tipo de população. A possibilidade de ambas infecções coexistirem no mesmo doente é elevada (Simonsen *et al.* 1988), tendo sido estabelecida uma associação entre infecção VIH e história de úlcera genital (Hook 1989, Kreis *et al.* 1988).

A coexistência de ambas as infecções tem levantado algumas questões aos diversos investigadores interessados nas infecções sexualmente transmissíveis (IST). Por exemplo, as alterações imunológicas ocasionadas por VIH poderão provocar, também, alterações nos testes serológicos utilizados no diagnóstico laboratorial da sífilis e na avaliação da evolução e da resposta à terapêutica efectuada. Para alguns investigadores, a presença de VIH e as alterações por ele originadas poderão alterar a história natural da sífilis (Johns *et al.* 1987, Berry *et al.* 1987, Gordon *et al.* 1994, Malone *et al.* 1995, O'Mahony *et al.* 1997), com o aparecimento de lesões mais severas, progressão mais rápida da infecção por *T. pallidum*, com diminuição do período de latência e aparecimento de neurosífilis, terapêutica habitual para sífilis ineficaz, assim como aparecimento precoce de neurosífilis em indivíduos correctamente tratados.

Através de estudos epidemiológicos foi possível estabelecer associação entre história de sífilis no passado (presença de úlcera genital e ou testes serológicos reactivos) e a presença de infecção por VIH (Ghys *et al.* 1995, Quinn *et al.* 1988, Simonsen *et al.* 1988, Stamm *et al.* 1988, Hook 1989). A úlcera genital constitui um co-factor de infecção por este vírus devido à presença de grande número de células inflamatórias como linfócitos e macrófagos, os quais constituem células alvo virais que aumentam a eficácia da inoculação por VIH (Hook 1992).

Pelo menos, aparentemente, parece plausível que as alterações da imunidade celular e humoral devidas à infecção por VIH (Bowen *et al.* 1985) limitem as defesas do hospedeiro contra a infecção por *T. pallidum*, alterando as manifestações clínicas e/ou a evolução natural da infecção sífilítica (Stamm *et*

al. 1988). A imunidade do hospedeiro, sobretudo a celular, tem um papel importante na protecção do mesmo à infecção por *T. pallidum* (Pavia *et al.* 1978). As alterações da imunidade celular na fagocitose e a incapacidade das células T cooperarem com as células B na formação de anticorpos, no contexto da infecção por VIH, podem facilitar a rápida progressão da sífilis. Por outro lado, nos períodos precoces da infecção sífilítica existe imunossupressão transitória, sobretudo celular (Fitzgerald 1981), pelo que aquela resulta numa evolução mais rápida da infecção treponémica, devido à acção sinérgica de ambos os agentes patogénicos. A própria inflamação meníngea, induzida por VIH, pode facilitar a penetração dos treponemas no sistema nervoso central, contribuindo para o desenvolvimento de neurosífilis sintomática (Johns *et al.* 1987, Berry *et al.* 1987, Lukehart *et al.* 1988, Hicks *et al.* 1987).

Se bem que a maioria dos doentes com infecções coexistentes apresente as manifestações típicas da sífilis, alguns casos relatados na literatura médica têm sugerido que o espectro clínico da infecção sífilítica e a progressão da doença poderiam ser modificados, no contexto da co-infecção (Johns *et al.* 1987, Musher *et al.* 1990, Hook 1989, Katz e Berger 1989, McLeish *et al.* 1990, Schofer *et al.* 1996).

Na maior parte dos indivíduos com infecção por VIH e por *T. pallidum* as manifestações dermatológicas da sífilis apresentam as características clínicas típicas de sífilis primária ou secundária, tais como úlcera e exantema maculo papular (Musher 1991, Hutchinson *et al.* 1994), embora em alguns estudos tenham sido observadas diferenças. Hutchinson *et al.* (1994), efectuaram um estudo comparativo de doentes com sífilis primária, secundária e latente precoce com e sem infecção por VIH, tendo concluído que havia maior probabilidade de desenvolvimento de doença secundária nos indivíduos infectados por aquele vírus, sobretudo quando presente contagem de linfócitos TCD4⁺ inferior a 500/mm³. Outro estudo efectuado numa clínica de IST concluiu que a presença continuada de úlcera genital no estágio de secundarismo era mais frequente nos indivíduos com infecção por VIH (Gourevitch *et al.* 1993). Outros autores observaram que nos indivíduos infectados por VIH, a probabilidade de surgirem úlceras múltiplas era maior (Rolfs *et al.* 1997, Rompalo *et al.* 2001b). Úlceras atípicas, incluindo lesões com

aparência de fissura ou de escoriações (Garcia-Silva *et al.* 1994) ou gomas ulcerativas do pênis (Kitchen *et al.* 1988, Hay 1990b), foram também descritas. Exantema com erupção papular ou nodular e centros necróticos (sífilis maligna) são algumas das manifestações descritas em doentes com infecção simultânea por *T. pallidum* e por VIH (Gregory *et al.* 1990, Tosca *et al.* 1990, Sands e Markus 1995, Don *et al.* 1995, Schofer *et al.* 1996, Tucker *et al.* 1997, Balachandran *et al.* 1997). No entanto, estas lesões da pele, caracterizadas como formas mais agressivas de secundarismo foram também observadas em doentes com sífilis e não infectados por VIH (Rademacher e Radolf 1996).

Quanto à maior probabilidade de desenvolvimento de neurosífilis, a questão tem sido alvo de alguma discussão e estudo. A maioria dos casos de neurosífilis em co-infectados surge sob a forma de neurosífilis do secundarismo, nomeadamente meningite sífilítica aguda (Flood *et al.* 1998). Foram, também, referidos casos pontuais de neurosífilis parenquimentosa, como síndrome medular com sífilis meningovascular (Tyler *et al.* 1994), *tabes dorsalis* (Calderon *et al.* 1990, Gue *et al.* 1993), meningiomielite sífilítica (Strom e Schneck 1991) e poliradiculopatia sífilítica (Lankska *et al.* 1988), manifestações oculares, entre as quais uveíte (Becerra *et al.* 1989, Shalaby *et al.* 1997, Flood *et al.* 1998) e otológicas com perda de audição (Smith e Canalis 1989, Tamesis e Foster 1990).

Nos doentes com co-infecção *T. pallidum* e VIH parece haver maior risco para recidiva, tendo sido referidos casos de recidiva neurológica após terapêutica com penicilina benzatínica (Tramont 1976, Berry *et al.* 1987, Johns *et al.* 1987, Lankska *et al.* 1988, Lukehart *et al.* 1988, Musher *et al.* 1990, Gordon *et al.* 1994, Malone *et al.* 1995,) ou ceftriaxona (Dowell *et al.* 1992). No entanto, num estudo prospectivo de 500 doentes com sífilis generalizada, com e sem infecção por VIH, nenhum caso de neurosífilis sintomática foi observado no período de 12 meses após a terapêutica (Rolf *et al.* 1997). Por estas razões, é fundamental a vigilância e a monitorização do resultado da terapêutica dos doentes infectados com os dois microrganismos.

No que diz respeito ao diagnóstico laboratorial, é importante conhecer a sensibilidade e a especificidade dos testes serológicos para o diagnóstico da sífilis nos doentes co-infectados por VIH, já que as alterações da função das

células B, traduzida por activação policlonal perante antigénios previamente conhecidos e por incapacidade de resposta a novos antigénios (Bowen *et al.* 1985) poderá alterar a resposta serológica. Terry *et al.* (1988) estudaram dois grupos de doentes com infecção por VIH, um com história anterior de sífilis e outro com infecção treponémica adquirida posteriormente à infecção viral. Esses investigadores demonstraram que em nenhum dos grupos a resposta serológica foi diferente da observada nos indivíduos com sífilis e sem infecção por VIH, concluindo que a resposta serológica à infecção a *T. pallidum* parece preservada nos indivíduos em estádios precoces da infecção viral.

No entanto, outros estudos têm demonstrado que os testes serológicos para o diagnóstico laboratorial de sífilis podem revelar resultados diferentes dos esperados, nos infectados por VIH, tendo sido registados títulos superiores ao que seria de esperar nos testes não treponémicos (Hutchinson *et al.* 1991, Gourevitch *et al.* 1993, Jurado *et al.* 1993), assim como atraso ou mesmo ausência de reactividade em doentes com sífilis secundária comprovada (Hicks *et al.* 1987, Gregory *et al.* 1990, Drabick e Tramont 1990, Tikjob *et al.* 1991).

Por outro lado, obtiveram-se reacções falsamente positivas em testes não treponémicos em infectados por VIH (Rompalo *et al.* 1992, Augenbraun *et al.* 1994, Rusnak *et al.* 1994). As taxas de reacções falsamente positivas são de cerca de 4% (Rompalo *et al.* 1992, Augenbraun *et al.* 1994, Rusnak *et al.* 1994) nos infectados por VIH e entre 0,2 a 0,8% nos não infectados, embora este facto segundo alguns autores, possa estar relacionado com a utilização de drogas endovenosas nos co-infectados (Singh e Romanowski 1999).

Os testes treponémicos podem apresentar, também, alterações na co-infecção. Num estudo com RPR reactivo de título superior ou igual a 1:8, efectuado por Erbeling *et al.* (1997) alguns doentes apresentavam teste FTA-Abs falsamente negativo, uma vez que nos mesmos doentes foram detectados anticorpos para os antigénios de 47 kDa e 17 kDa de *T. pallidum*.

Os testes serológicos para o diagnóstico da sífilis continuam, no entanto, a ser de grande utilidade, devendo-se ter presente a possibilidade de determinadas alterações se verificarem. Assim, perante um doente com infecção por VIH e suspeita de infecção a *T. pallidum* deve-se ter em consideração todo um conjunto de factores como a história clínica, o exame objectivo, o exame

microscópico para a observação dos treponemas a partir de lesões suspeitas, os testes serológicos e, na evidência clínica de envolvimento neurológico, a punção lombar para exame do liquor. A neurosífilis é um diagnóstico a considerar no diagnóstico diferencial de doença neurológica dos infectados por VIH, tornando-se mais difícil neste caso, visto que, 40% da população infectada por VIH pode apresentar alterações do exame citoquímico do liquor, incluindo aumento dos leucócitos e das proteínas (Singh e Romanowski 1999). O diagnóstico de neurosífilis, sobretudo quando assintomática, baseia-se nas alterações encontradas no exame citoquímico (aumento de células mononucleadas e das proteínas) e num teste de VDRL reactivo no liquor. Quando este é negativo então o diagnóstico torna-se mais complicado, devido à ausência de outros testes de diagnóstico laboratorial que permitam diferenciar entre doença neurológica devida a infecção por *T. pallidum* e à determinada por VIH ou por outro agente patogénico que possa estar presente e que muitas vezes surge nos estádios avançados da infecção por VIH. A maioria dos doentes com co-infecção por VIH e por *T. pallidum* e neurosífilis sintomática apresentam, no liquor, o VDRL reactivo e significativo aumento na contagem dos linfócitos (Matlow e Rachlis 1990; Flood *et al.* 1998). Contudo, foram observados doentes com infecção por VIH e teste VDRL negativo que, mais tarde, apresentaram neurosífilis sintomática, sugerindo que a neurosífilis pode não ser diagnosticada e tratada se apenas se tiver em conta os resultados daquele teste (Feraru *et al.* 1990). Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novos testes que permitam o diagnóstico de neurosífilis activa. Alguns autores têm sugerido a pesquisa de antígenos treponémicos e o isolamento do agente (Hart G. 1986, Tomberlin *et al.* 1994) e/ou a detecção de ADN de *T. pallidum* (Hay *et al.* 1990a, Burstain *et al.* 1991). No entanto, estes métodos ainda não estão, adequadamente, validados.

Do ponto de vista terapêutico, torna-se premente saber se o esquema recomendado para a sífilis recente é eficaz no caso da co-infecção por VIH, já que alguns autores sugerem que não seria suficiente para prevenir a evolução para estádios mais avançados, incluindo a neurosífilis (Markovitz *et al.* 1986, Guinan 1987, Johns *et al.* 1987). Tal facto estaria associado à imunodeficiência, do doente infectado pelo vírus VIH, permitindo uma maior

proliferação e disseminação dos treponemas. Esta questão coloca-se sobretudo no tratamento de sífilis recente com uma dose única de penicilina G benzatínica, já que a neurosífilis do período de generalização ou sífilis oftálmica foi referida em alguns destes casos, sugerindo que a mesma não tinha sido suficientemente eficaz (Katz e Berger 1989, McLeish *et al.* 1990, Musher *et al.* 1990, Berry *et al.* 1987). No entanto, a latitude desse risco não ficou esclarecida, considerando a maior parte dos autores que será mínimo, pelo que se recomenda apenas uma observação neurológica cuidadosa do doente. Lukehart *et al.* (1988) efectuaram um estudo prospectivo em doentes com sífilis não tratada aos quais foi efectuada punção lombar, tendo sido pesquisado *T. pallidum* no liquor por inoculação no coelho. O microrganismo foi isolado em 30% dos indivíduos com sífilis primária e com sífilis secundária. O isolamento de *T. pallidum* apresentou-se significativamente associado à presença de uma ou mais alterações no exame do liquor (aumento do número de células, de proteínas e teste de VDRL reactivo). No entanto, a concomitante infecção por VIH não se associou com o aumento do isolamento de *T. pallidum*, nem com o aumento do número de células no exame do liquor, embora fosse mais frequente um número de leucócitos superior a 5/mm³.

Em todos os doentes com sífilis, com ou sem co-infecção por VIH recomenda-se a terapêutica com penicilina em todos os estádios da infecção sífilítica, sendo que a terapêutica dos co-infectados não difere da utilizada nos imunocompetentes com sífilis (Flood *et al.* 1998, WHO 2001, CDC 2002a). Alguns investigadores têm recomendado tratamentos adicionais como as doses múltiplas recomendadas para a sífilis latente tardia ou suplementar com outro antibiótico como a amoxicilina, a qual teria o benefício, pelo menos teórico, de melhor penetração no liquor, atingindo níveis treponemicidas (Faber *et al.* 1983, Morrison *et al.* 1985, Hay *et al.* 1990c, Musher 1991), no entanto, não foram encontrados benefícios aumentados no resultado do ensaio clínico de comparação de terapêutica de sífilis recente de duração inferior a um ano, com e sem amoxicilina.

6. Diagnóstico laboratorial

Em comparação com outras infecções sexualmente transmissíveis, o diagnóstico laboratorial de infecção a *T. pallidum* é complicado, colocando desafios, quer do ponto de vista clínico quer do ponto de vista laboratorial.

T. pallidum é de difícil detecção durante as fases de latência e/ou quando em circulação ou no liquor, não sendo cultivável em meios laboratoriais sem células. Por isso, o diagnóstico da sífilis está dependente da integração dos dados clínicos com os laboratoriais.

Os diferentes métodos laboratoriais a utilizar e a sua eficácia (sensibilidade e especificidade) estão dependentes da fase clínica da doença, e vão desde a identificação do microrganismo, do seu ADN ou da presença de anticorpos anti-*T. pallidum*.

6.1 Métodos de detecção directa de *Treponema pallidum*

A primeira associação entre sífilis e o seu agente, foi efectuada em 1905 por Schaudinn e Hofmann ao identificarem *Spirochaeta pallida*, (Tabela 2) utilizando um método de coloração de Giemsa modificado, para observar esfregaços obtidos a partir de amostras colhidas das úlceras. Em 1909, Coles (citado por Larsen *et al.* 1998) utilizou a microscopia de fundo escuro para a observação do mesmo microrganismo, referindo, sobretudo, a sua mobilidade. Em 1964, foi utilizado um método de fluorescência directa, desenvolvido por Yobs *et al.*, o qual foi modificado em 1985 por Hook e seus colaboradores pela utilização de anticorpos monoclonais. Mais recentemente, e com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, a técnica de PCR começou a fazer parte do arsenal de testes, utilizáveis para o diagnóstico laboratorial de sífilis.

Tabela 2. História dos testes para diagnóstico de sífilis – detecção directa de antígeno*

Ano	Autores	
1905	Schaudinn e Haufmann	Associaram <i>Spirochaeta pallida</i> (<i>Treponema pallidum</i>) com sífilis
1909	Coles	Descreveu uso de microscopia de fundo escuro
1964	Yobs <i>et al.</i>	Desenvolveram teste de fluorescência directa com utilização de um anticorpo específico
1991	Grimprel <i>et al.</i>	Descreveram a técnica de reacção da polimerase em cadeia (PCR) para diagnóstico de sífilis congénita
1991b	Noordhoek <i>et al.</i>	Aplicaram a técnica de PCR ao diagnóstico de sífilis

*Adaptado de Larsen *et al.* (1998)

6.1.1. Microscopia de fundo escuro

A microscopia de fundo escuro é o método mais antigo, simples, mas ainda de extrema utilidade para identificação de *T. pallidum*.

Devido à sua diminuta espessura, os treponemas não podem ser observados com a luz normal do microscópio, sendo necessário um microscópio equipado com um condensador de raios reflectidos, simples ou duplo. A iluminação para a observação em campo escuro é obtida quando os raios de luz atingem o objecto no campo de microscópio em ângulo oblíquo, de modo a que apenas os raios de luz que se reflectem no objecto entrem no microscópio (Kennedy e Creighton 1998b), aparecendo o mesmo iluminado contra um fundo escuro.

Um microscopista experiente pode identificar *T. pallidum* a partir das ulcerações sífilíticas pelas suas características morfológicas e de movimento, diferenciando-o das outras espiroquetas. *T. pallidum* apresenta uma forma característica em saca-rolhas com espirais uniformes, estreitas e profundas. Quanto à sua mobilidade pode diferenciar-se um movimento de translação

(movimento uniforme em linha recta), lento, de diante para trás com movimentos ocasionais erráticos, um movimento de rotação lento a rápido em volta do eixo longitudinal como um saca-rolhas, podendo rodar sem sair do mesmo sítio, e um movimento de flexão. A rotação é acompanhada de movimento de ondulação ou flexão que origina efeito de luz trémula. O movimento de flexão do microrganismo ocorre geralmente na zona média e de forma rígida, semelhante a uma mola quando é libertada. Apesar de todas estas características não é possível diferenciar *T. pallidum* subespécie *pallidum* dos outros treponemas patogénicos através desta técnica. Os microrganismos que mais facilmente se confundem com *T. pallidum* são *Treponema refringens* e *Treponema denticola*.

A microscopia de fundo escuro é o método de eleição quando existem lesões, como na sífilis primária, secundária e congénita precoce, sendo particularmente útil quando ainda não são detectáveis os anticorpos.

Para a execução da técnica é necessária a colheita de amostra apropriada, a qual consiste em líquido seroso, livre de eritrócitos, de outros microrganismos e de restos celulares. A lesão deve ser limpa, se contiver restos tecidulares ou estiver obviamente contaminada, com água estéril ou com soro fisiológico. Porque a viabilidade dos treponemas é indispensável para identificar *T. pallidum* é necessário que a observação seja efectuada logo após a colheita. As lesões do colo uterino e da vagina podem também ser observadas por esta técnica se todas as precauções forem tomadas na colheita. No entanto, tal não é possível para lesões da boca, já que mesmo para microscopistas experientes é muito difícil ou mesmo impossível diferenciar *T. pallidum* das espiroquetas saprófitas que se podem encontrar nessa localização. No entanto, exceptuam-se as lesões de recém-nascido com sífilis em que a microscopia de fundo escuro é recomendada por ainda não existirem espiroquetas saprófitas.

A técnica apresenta alguns limites de sensibilidade (Tabela 3). Um resultado negativo por microscopia de fundo escuro não exclui o diagnóstico, existindo factores técnicos que podem levar a esse resultado, como pouca amostra na lâmina com rápida secagem da preparação, demasiado líquido, o qual pode dificultar a observação do movimento dos treponemas, ou lamela com grossura inapropriada que leva a dificuldades de focagem. Se o doente tiver utilizado

terapêutica tópica os treponemas móveis, podem não se observar, mesmo quando várias amostras são examinadas. O contrário também pode suceder com resultados falso positivos resultantes da presença de espiroquetas não patogênicas, ou para um observador pouco experiente, da presença de fibras de algodão e movimentos brownianos.

Tabela 3 – Sensibilidade dos métodos de detecção directa de *T. pallidum* *

Método	Amostra	Nº mínimo de organismos presentes	Sensibilidade %	Referências
Microscopia de fundo escuro	5 µl de exsudado	50	73.8 - 78.8	Kennedy e Creighton (1998b)
Teste de fluorescência directa	5 µl de exsudado	50	73 - 100	Romanowski <i>et al.</i> (1987), George <i>et al.</i> (1998a)
PCR-DNA	5 µl de exsudado	1-10	Cerca de 100	Hay <i>et al.</i> (1990a) Burstain <i>et al.</i> (1991), Wicher <i>et al.</i> (1992) Orle <i>et al.</i> (1996) Liu <i>et al.</i> (2001)
RT-PCR	1 µl de exsudado	1	Cerca de 100	Centurion-Lara <i>et al.</i> (1997)

* Adaptado de Wicher *et al.* (1999)

6.1.2. Teste de imunofluorescência directa (DFA-TP)

A técnica de imunofluorescência directa (DFA-*Treponema pallidum*) pode ser utilizada em substituição da microscopia de fundo escuro na observação de amostras de exsudados de lesões e de fluídos orgânicos (Yobs *et al.* 1964, Jue *et*

al. 1967, Daniels e Ferneyhough 1977, Ito *et al.* 1992), permitindo identificar os microrganismos pela utilização de anticorpos anti-*T. pallidum* marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) tendo, também, a vantagem da colheita poder ser efectuada durante a observação clínica e enviada para laboratório de referência.

Os anticorpos anti-*T. pallidum* marcados são preparados a partir de soro humano ou de coelho com sífilis após adsorção com *Treponema* de Reiter, a fim de os tornar específicos, ou com anticorpos anti-*T. pallidum* monoclonais (Romanowski *et al.* 1987, Ito *et al.* 1991, 1992, George *et al.* 1998a). A adsorção é necessária porque *T. pallidum* compartilha antigénios com uma grande variedade de microrganismos. A especificidade da técnica permite que a mesma seja efectuada em amostras colhidas de lesões da boca, rectais ou intestinais, mas não permite o diagnóstico diferencial com os outros treponemas patogénicos, mesmo quando se utilizam anticorpos monoclonais.

Para a sua execução deve ser efectuada esfregaço a partir de exsudado da lesão, o qual será fixado com acetona ou com etanol a 100% se se utiliza anticorpo monoclonal (Larsen *et al.* 1998). A colheita efectua-se do mesmo modo que para observação em fundo escuro. Se os treponemas estiverem presentes, serão evidenciados pela incubação das lâminas fixadas com antiglobina anti-*T. pallidum* marcada com FITC e observadas em microscópio de fluorescência (George *et al.* 1998a).

A sensibilidade da técnica é próxima de 100% quando executada a partir de material colhido recentemente (Ito *et al.* 1992, Daniels e Ferneyhough 1977). Tal como no estudo por microscopia de fundo escuro, a amostra não deve apresentar restos celulares ou eritrócitos, o que dificulta a observação. Young (1992a) sugeriu que seriam necessárias três amostras, colhidas em dias consecutivos, para se considerar o resultado negativo. Em casos de lesões suspeitas, a presença de treponemas detectados por esta técnica é diagnóstico definitivo. Um resultado negativo não exclui o diagnóstico, dado que a sensibilidade da técnica depende da idade da lesão, do tratamento antes da colheita ou de má técnica de colheita, factores estes que podem diminuir a capacidade de se identificar *T. pallidum*. O método tem sido utilizado, também, para detectar *T. pallidum* em tecidos (George *et al.* 1998d). A combinação do

teste de imunofluorescência directa para *T. pallidum* com as colorações histológicas de tecidos permite o exame de amostras de biopsias e de autópsias. Esta metodologia de diagnóstico tem sido aplicada, sobretudo, a cortes de tecidos embebidos em parafina, colhidos de cérebro, aparelho gastrointestinal, cordão umbilical ou pele (Larsen *et al.* 1998). O teste tem sido utilizado para diagnóstico de sífilis tardia, sífilis congénita ou para diferenciar lesões sifilíticas da pele daquelas causadas pela doença de Lyme (Ito *et al.* 1992).

6.1.3. Coloração pela prata

A coloração pela prata tem sido muito utilizada pelos anatomopatologistas, no entanto não é específica para *T. pallidum*. O nitrato de prata impregna diferentes microrganismos, sendo a identificação efectuada pela morfologia. Um factor potencial de erro é a presença de artefactos teciduais, pelo que é aconselhável a utilização de testes com anticorpo específico marcado com fluoresceína (Ito *et al.* 1991).

6.1.4. Detecção directa de antigénio

6.1.4.1. Inoculação em modelo animal

A técnica mais antiga para detectar infecção a *T. pallidum* é o teste de infecciosidade no animal, sendo, ainda, o método mais sensível para a detecção de treponemas infecciosos (Wilcox e Guthe 1966).

Muitas espécies de animais como hamsters, chimpanzés e coelhos foram utilizados para manutenção dos treponemas ou para determinar a infecciosidade dos mesmos (Wilcox e Guthe 1966), mas as manifestações de infecção ou a reactividade serológica não se desenvolvem em todos. O coelho é o animal mais utilizado, porque desenvolve lesão no local de inoculação, podendo a infecção ser transferida de animal para animal e porque apresenta reactividade serológica.

O teste de infecciosidade no coelho (rabbit infectivity test – RIT) é o mais utilizado para a detecção de infecção por *T. pallidum* (Magnuson *et al.* 1948, citado por Larsen *et al.* 1995), por inoculação intratesticular da amostra a estudar.

A sensibilidade do teste é cerca de 100% se o número de microrganismos presentes no inóculo for superior a vinte e três e o doente não tiver sido previamente tratado. O RIT tem sido utilizado como teste padrão para determinar a sensibilidade de métodos como a pesquisa de ADN de *T. pallidum* em amostras clínicas por técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR) (Grimprel *et al.* 1991, Sanchez *et al.* 1993, Wicher *et al.* 1998).

Qualquer tipo de amostra pode ser utilizada para a sua execução, desde que a inoculação seja efectuada até uma hora após colheita ou congelada de imediato e mantida em azoto líquido ou a temperatura inferior a 78°C (Larsen *et al.* 1995) até ser utilizada. As amostras são, em geral, inoculadas por via intratesticular ou intradérmica, sendo o período de incubação no animal, inversamente proporcional ao tamanho do inóculo. Embora com boa sensibilidade, (10 a 50 microrganismos - Wicher *et al.* 1999) é pouco prática para o diagnóstico de rotina, por ser cara, laboriosa e necessitar de condições especiais para a manutenção dos animais.

6.1.4.2. Teste imunoenzimático directo

Como método alternativo à microscopia, para a detecção de *T. pallidum* em lesões sífilíticas do estágio recente, foi utilizada uma técnica imunoenzimática indirecta de captura (White e Fuller 1989) “Visuwell Syphilis Antigen EIA test” (ADI Diagnostics, Canada). O material é colhido por zaragatoa, sendo de seguida o antigénio extraído e colocado em contacto com um anticorpo monoclonal reactivo à proteína de 47kDa de *T. pallidum*, previamente fixado nos poços de uma placa. A detecção é efectuada por anticorpo anti-*T. pallidum* policlonal de coelho. O teste permite a leitura de uma reacção enzimática colorimétrica, podendo ser executado no próprio dia da colheita. Cummings *et al.* (1996) compararam-no com a microscopia de fundo escuro e com a técnica de imunofluorescência directa. O teste imunoenzimático e a microscopia de

fundo escuro apresentaram resultados positivos, respectivamente em 81.3% (52/64) e 85.9 % (55/64) dos doentes, enquanto que a coloração de imunofluorescência com anticorpo monoclonal demonstrou a presença de *T. pallidum* em 92.2 % (59/64) dos doentes.

O teste apresentou especificidade de 89,5%, com resultados positivos em 13 dos 124 que tinham resultados negativos em microscopia de fundo escuro e em imunofluorescência. Os resultados obtidos demonstraram que esta técnica é menos sensível e específica que as outras duas, razão provável porque acabou por ser abandonada.

6.1.4.3. Sondas de ADN

As sondas de ADN no diagnóstico laboratorial da sífilis, não têm sido muito utilizadas, talvez devido à incompleta compreensão da biologia do microrganismo, o que dificulta a selecção de antígeno ou sequências de ADN alvo. No entanto, foram utilizadas sondas de ADN (Wilkinson *et al.* 1986, Viscidi e Yolken 1987) para a identificação de outros microrganismos patogénicos importantes, assim como foram efectuadas experiências com outras espiroquetas, o que indica a potencialidade do método ser aplicável à identificação de *T. pallidum* (Terpstra *et al.* 1986). Ensaaios “Dot-blot”, baseados em sondas de ADN para identificar *T. pallidum*, parecem não apresentar a sensibilidade desejada para um método diagnóstico, mas não foi feita qualquer tentativa de optimização da técnica, como o de determinar quais as sequências mais apropriadas, pelo que o potencial do método está ainda por definir (Terpstra *et al.* 1986). Muitas das situações de sífilis (neurossífilis, sífilis congénita) de diagnóstico problemático, devido ao pequeno número de microrganismos presentes nas amostras, poderiam eventualmente ser resolvidas por uma técnica de maior sensibilidade como esta. A sequenciação do genoma (Frazer *et al.* 1998) deste microrganismo poderá vir a ajudar a desenvolver esta técnica, tornando mais fácil a pesquisa de genes alvos para este tipo de método.

6.1.4.4. Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR) permite amplificar selectivamente uma sequência de ADN alvo em mais de 10^6 vezes e, pelo menos, teoricamente, detectar um único microrganismo (Saiki *et al.* 1988, Eisenstein 1990), sendo assim um método que oferece grandes possibilidades de aplicação clínica.

Diversos investigadores desenvolveram testes baseados na técnica de PCR, quer como método potencial de diagnóstico laboratorial de sífilis, quer para a identificação de *T. pallidum* (Hay *et al.* 1990a e 1990b, Burstain *et al.* 1991, Grimpel *et al.* 1991, Noordhoek *et al.* 1991, Wicher *et al.* 1992, Sanchez *et al.* 1993, Jethwa *et al.* 1995, Centurion-Lara *et al.* 1997). No entanto, a técnica não se encontra ainda padronizada.

No que se refere aos diferentes registos são encontradas diferenças inter-laboratórios, quer na origem das sequências iniciadoras ou “primers”, quer no método de extracção. Apesar dos diferentes métodos, a sensibilidade da PCR registada pelos mesmos laboratórios foi de um a cinco microrganismos por amostra (Hay *et al.* 1990a, Noordhoek *et al.* 1991, Burstain *et al.* 1991, Wicher *et al.* 1992, Grimpel *et al.* 1991, Sanchez *et al.* 1993, Liu *et al.* 2001).

A aplicação da técnica de PCR em modelos animais experimentais de sífilis tem também permitido informações úteis. Wicher *et al.* (1992, 1996 e 1998) observaram que o sangue total é preferível ao soro para a execução da técnica. Das 18 amostras de soro de animais cuja PCR foi positiva no sangue total, somente um soro foi positivo (Wicher *et al.* 1992). Os mesmos autores, ao efectuarem estudos em coelhos infectados experimentalmente, demonstraram que a coagulação do sangue colhido para o estudo, aprisionava os microrganismos. Todos os coágulos estudados foram positivos pela técnica de PCR, enquanto que os respectivos soros foram negativos (Wicher *et al.* 1999). No entanto, tem sido enfatizado que a técnica de PCR não permite diferenciar entre microrganismos vivos e mortos. Este problema foi também avaliado em condições experimentais utilizando PCR e RIT. Estirpes de *T. pallidum* mortos pelo calor (Wicher *et al.* 1998) e inoculados em coelhos foram eliminados até 10 dias após a inoculação intratesticular e até 15 dias quando inoculados na pele.

Contudo, quando o ADN era injectado (10fg a 10 ng) em múltiplos locais da pele e intratesticularmente a eliminação deu-se em 24 a 48 horas, pelo que os autores concluíram que a identificação de ADN de *T. pallidum* por uma reacção de PCR positiva será indicativo de infecção activa.

Os vários métodos de PCR utilizados têm sido desenvolvidos com a finalidade de permitir um diagnóstico mais seguro de sífilis, principalmente na neurosífilis, sífilis congénita e sífilis primária ou mesmo para aumentar a sensibilidade das técnicas de diagnóstico laboratorial.

A maior parte desses testes utilizam sequências iniciadoras para genes que codificam lipoproteínas de membranas, os quais têm sido clonados e sequenciados. Esse trabalho tem sido favorecido pelo facto do *T. pallidum* ser conservado geneticamente.

Hay *et al.* (1990a) utilizaram uma técnica de PCR para o estudo de líquidos de doentes com sífilis. Estes investigadores amplificaram segmentos dos genes *TmpA* (que codifica para a proteína de membrana de 45 kDa) e da proteína 4D, sendo detectado 65 microrganismos no líquido onde previamente tinha sido colocado *T. pallidum* estirpe de Nichols. A especificidade da técnica foi de 96,7%, tendo os autores testado 30 amostras de líquidos de indivíduos não suspeitos de infecção por VIH e/ou sífilis. Como as amostras positivas não puderam ser confirmadas por RIT, não foi possível determinar a sensibilidade da técnica PCR. Na mesma altura, Burstain *et al.* (1991) desenvolveram um ensaio PCR, o qual amplificava um fragmento de 658 pb do gene da lipoproteína de membrana de 47 kDa. Os autores referem ter amplificado ADN de *T. pallidum* em amostras de soro, líquido e líquido amniótico de doentes com sífilis. Para confirmar a especificidade da técnica utilizaram uma sonda de 496 pb interna ao produto de 658 pb. Os resultados positivos pela técnica e confirmados por RIT foram obtidos no estudo de líquido amniótico de duas mulheres grávidas com sífilis latente não tratada, no soro e no líquido de uma doente com sífilis latente precoce cujo líquido apresentava testes normais e no líquido de uma doente com meningite sífilítica. Trata-se, no entanto, de um estudo limitado pelo pequeno número de amostras estudadas. Grimpel *et al.* (1991), utilizando a metodologia descrita por Burstain *et al.*, efectuaram um estudo com o objectivo de utilizarem a técnica no diagnóstico de sífilis

congénita. Para tal, amplificaram o ADN de *T. pallidum* no líquido amniótico, liquor e soro de recém-nascidos. O ensaio de PCR foi 100% específico para *T. pallidum* quando comparado com RIT para todas as amostras testadas. A técnica de PCR no líquido amniótico foi 100% sensível, quando correlacionada com RIT, mas a sensibilidade foi mais baixa quando aplicada aos soros e aos liquores dos 21 recém-nascidos de mães com sífilis investigados. Comparada a técnica de PCR com a RIT, a sensibilidade foi de 60% (3/5) nos liquores dos recém-nascidos e de 67% (4/6) nos soros dos mesmos, tendo os autores considerado que a menor sensibilidade poderia ser devida ao pequeno número de treponemas existentes no sangue e no liquor. Assim, foi concluído que, técnica de PCR pode ser útil no diagnóstico da sífilis congénita.

Com a finalidade de se verificar o interesse da técnica de PCR no diagnóstico de neurosífilis, Noordodhoek e seus colaboradores (1991) experimentaram-na no estudo de doentes com neurosífilis antes e após terapêutica. Utilizando como alvo o gene *bmp* de *T. pallidum* da proteína básica de membrana de 39-kDa, a sua primeira escolha nas sequências iniciadoras resultou em ensaios de pouca sensibilidade, pelo que desenvolveram em seguida uma “nested-PCR”. Antes da terapêutica com penicilina, o ADN de *T. pallidum* foi detectado em 71% (5/7) dos doentes com neurosífilis aguda, em nenhum dos quatro doentes com neurosífilis parenquimatosa e em 12,5% (2/6) dos doentes com neurosífilis assintomática. Estes resultados podem, no entanto, representar uma subestimativa da sensibilidade da técnica PCR porque as amostras foram colhidas muito tempo antes e conservadas sem os cuidados especiais para prevenir a degradação do ADN. Os autores detectaram ADN de *T. pallidum* no liquor de cinco dos sete doentes após terapêutica.

Jethwa *et al.* (1995) compararam a técnica de PCR com a imunofluorescência directa para a detecção de *T. pallidum* em amostras de doentes com úlceras sífilíticas. Neste caso, a técnica de PCR amplificava um fragmento de 658 pb do gene da proteína de membrana de 47kDa enquanto que a técnica de fluorescência utilizava um anticorpo monoclonal específico de *T. pallidum* para o antígeno de 37 kDa marcado com fluoresceína. Esfregaços de úlceras genitais de 165 doentes foram corados, pela técnica de imunofluorescência. Após o exame ao microscópio, o esfregaço era raspado para extracção do ADN a ser

utilizado para a técnica de PCR. Vinte e duas das 165 amostras foram positivas para *T. pallidum* por imunofluorescência e PCR, enquanto que 127 foram negativas por ambas as técnicas, o que resultou numa concordância de 95,5% ($\kappa=0.84$). Quatro amostras positivas pela técnica de PCR foram negativas pela fluorescência, enquanto que três das negativas pela técnica de PCR foram positivas por fluorescência. No que se refere às primeiras, os autores põem a hipótese do resultado ser devido ao grande número de leucócitos presentes no esfregaço, o que dificulta a visualização dos treponemas, enquanto que os resultados de fluorescência positivos e da técnica de PCR negativas seriam devidos à ineficácia da extracção do ADN. A inibição da técnica de PCR foi excluída, porque o ADN purificado, foi amplificado quando adicionado a alíquotas de cada amostra.

Os resultados obtidos pelo estudo mostraram que a técnica de PCR e a de imunofluorescência directa são métodos equivalentes para a detecção de *T. pallidum* em amostras de úlceras genitais.

O gene *polA* treponémico codifica para uma proteína enzimática, a ADN polimerase I, a qual em *T. pallidum* subespécie *pallidum* parece apresentar algumas características especiais. A comparação da sequência de aminoácidos da enzima de *T. pallidum* com a de enzimas ADN polimerase I de seis outras bactérias diferentes (*Escherichia coli*, *Borrelia burgdoferi*, *Thermus aquaticus*, *Dienococcus radiodurans*, *Mycobacterium tuberculosis*, e *Streptococcus pneumoniae*) revelou duas características: um elevado conteúdo em cisteína e quatro inserções no domínio 3'-5' da exonuclease, sem homologias com os outros genes *polA* sequenciados. Dois resíduos de cisteína estão, também, presentes nas sequências I e II da exonuclease 3'-5'.

Esta característica parece ser única para a enzima ADN polimerase de *T. pallidum* (Rodes *et al.* 2000), razão pela qual Liu *et al.* (2001) desenvolveram uma técnica de PCR tendo o gene *polA* como alvo, o que, eventualmente, a tornaria mais específica e sensível. Inicialmente, desenharam dois pares de sequências iniciadoras F1/R1 e F2/R2, os quais originam respectivamente produtos com 377 e 395 pares de bases, tendo em consideração as sequências de ADN correspondentes às regiões de aminoácidos que apresentam as inserções adicionais e o elevado conteúdo em cisteínas. F1/R1 incluem duas

cisteínas na sequência a montante e uma na sequência a jusante, enquanto que F2/R2 contém duas cisteínas em cada uma das sequências iniciadoras. A detecção dos produtos foi efectuada por visualização em gel e em sequenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems).

Para esta análise as sequências iniciadoras foram marcadas com marcadores fluorescentes. Os investigadores efectuaram estudo de especificidade utilizando um painel de microrganismos onde incluíram outros agentes de infecções sexualmente transmitidas (*Neisseria gonorrhoea*, *Chlamydia trachomatis*, Vírus Herpes Simplex tipo 1 e 2 e *Trichomonas vaginalis*), outras espiroquetas, incluindo as patogénicas para o homem, *Borrelia burgdoferi* e ainda outros agentes que não espiroquetas, tendo sido verificada boa especificidade e sensibilidade. Geralmente, o limite de detecção de produtos pela técnica de PCR quando visualizado em gel de agarose, corresponde à presença de 10 a 50 microrganismos. No entanto, a utilização do analisador genético permitiu aos autores aumentar a sensibilidade para 1 log, o que é vantajoso para a pesquisa de ADN em amostras que contenham pequeno número de microrganismos, como é o caso do sangue e do liquor. Os autores utilizaram esta técnica para pesquisa de ADN de *T. pallidum* em amostras de úlceras genitais, comparando os resultados obtidos com os previamente encontrados com a utilização de técnica de “multiplex-PCR”, tendo obtido uma sensibilidade de 95,8% e uma especificidade de 95,7%. Esta mesma técnica aplicada a amostras de sangue total (Marfin *et al.* 2001) permitiu a amplificação de 13 das 32 amostras (41%) de doentes com sífilis não tratada e em período de incubação, demonstrando-se assim a existência de espiroquetémia no decurso do estágio recente da infecção por *T. pallidum*.

6.1.4.5. Multiplex – PCR (M-PCR)

As úlceras genitais têm como agentes mais frequentes *T. pallidum*, o vírus herpes simplex e/ou *Haemophilus ducreyi*. Devido ao maior risco de transmissão da infecção por VIH em indivíduos com úlceras genitais, a terapêutica eficaz precoce é importante na doença úlcero-genital. Contudo, o tratamento orientado para cada um dos microrganismos é diferente, pelo que a

sua identificação é crítica para uma terapêutica apropriada. Orle e colaboradores (1996) associados à Roche Molecular Systems na Califórnia, USA, desenvolveram um método de PCR que permite a detecção simultânea dos três microrganismos (*T. pallidum*, *H. ducreyi*, vírus herpes simplex tipo 1 e tipo 2), designada técnica de “multiplex-PCR” (M-PCR). Esta técnica emprega três pares de sequências iniciadoras diferentes (uma para cada microrganismo) para a amplificação de um fragmento do ADN de cada um dos três microrganismos no mesmo tubo de reacção. A detecção dos produtos é em seguida efectuada por uma técnica de captura, utilizando sondas de oligonucleótidos específicos para cada um dos microrganismos e uma reacção colorimétrica.

A técnica de M-PCR, quando avaliada independentemente para cada microrganismo, apresentou sensibilidade de um a 10 microrganismos, embora a presença simultânea dos três microrganismos no mesmo tubo de reacção, a sensibilidade fosse de 10 microrganismos. Os autores utilizaram a técnica em 295 úlceras de doentes do sexo masculino que foram observados em consulta de doenças sexualmente transmissíveis, tendo executado microscopia de fundo escuro e a técnica de M-PCR. A comparação dos dois métodos demonstrou sensibilidade de 91% e 81% e especificidade de 99% e 100% para as técnicas de PCR e microscopia de fundo escuro, respectivamente. A concordância da técnica de M-PCR com uma outra técnica de PCR confirmatória para *T. pallidum* foi de 99,3%.

A técnica M-PCR parece ser uma técnica promissória para o diagnóstico de úlcera genital, apresentando ainda a vantagem de permitir o diagnóstico diferencial com os outros agentes de úlceras genitais, *H. ducreyi*, HSV-1 e 2, num mesmo tubo de reacção.

Apesar do teste não se encontrar comercializado, Morse *et al.* (1997), utilizaram a técnica de M-PCR comparando-a com métodos laboratoriais padrão em 105 doentes com úlceras genitais. Registaram sensibilidade de 95% na técnica de M-PCR para a identificação de ADN de *H. ducreyi* e de 93% para o vírus herpes simplex, tendo as sensibilidades destes dois microrganismos em cultura sido de 75% e 60%, respectivamente. No que se refere à sífilis, os autores obtiveram positividade de 8% nas amostras estudadas, mas não foi possível efectuar estudo de sensibilidade, porque a microscopia de fundo escuro não foi

executada e os testes serológicos nesta fase da doença são relativamente insensíveis e inespecíficos (Larsen *et al.* 1995), não permitindo a comparação. Os autores referem que a técnica de PCR melhorou o diagnóstico das úlceras genitais, tendo reduzido o número de diagnósticos indeterminados, de 35% para 6%, sendo o principal factor para essa diminuição a maior sensibilidade da técnica de M-PCR e a sua capacidade para detectar *T. pallidum* nas amostras de úlceras. A técnica foi, também, utilizada noutros estudos (Beyer *et al.* 1998, Risbud *et al.* 1999, Behets *et al.* 1999), com bons resultados na discriminação dos agentes de úlcera genital, isto é, *T. pallidum*, *H. ducrey* e vírus herpes simplex.

Mais recentemente, Bruisten *et al.* (2001) utilizaram uma técnica M-PCR para o diagnóstico diferencial de úlceras genitais, embora utilizando sequências iniciadoras para genes diferentes. Também observaram uma maior sensibilidade desta técnica no diagnóstico laboratorial desta situação clínica.

6.1.4.6. Reacção da transcriptase reversa (RT-PCR)

As diversas técnicas de PCR que têm sido desenvolvidas para o diagnóstico de sífilis, não têm, ainda sensibilidade adequada. Os investigadores Centurion-Lara *et al.* (1997) efectuaram uma experiência utilizando uma mistura de líquidos humanos adicionados de *T. pallidum*. Para a identificação do microrganismo por técnica de PCR, foram utilizadas sequências iniciadoras para o gene 16S ARNr, sendo os produtos de amplificação, em seguida, detectados por *southern blot*. Os resultados obtidos foram comparados com a técnica de PCR para o gene da proteína TpN47. A técnica RT-PCR detectou o mínimo de um microrganismo, sendo mais sensível que a ADN-PCR, em que o mínimo detectado foi de 10 microrganismos. O procedimento está, ainda, para avaliar em amostras clínicas. Os autores fazem, ainda, notar que a técnica é de mais difícil execução, porque o ARN é rapidamente degradado, o que pode limitar a sua utilidade.

6.2. Métodos serológicos

Os testes serológicos são o método mais utilizado no diagnóstico laboratorial da sífilis, considerados como métodos indirectos de diagnóstico, identificam anticorpos produzidos em resposta à infecção por *T. pallidum*. Estes começam a ser detectáveis no estágio primário (duas a três semanas após a infecção) e aumentam de concentração no estágio de generalização. Durante a infecção, são produzidos dois tipos de anticorpos: não treponémicos e treponémicos, sendo os primeiros também designados como fosfolipídicos, cardiolipina ou não específicos, e os segundos específicos. Embora seja, ainda, desconhecido o antígeno responsável pela estimulação dos anticorpos anticardiolipina, os resultados dos estudos de alguns investigadores (Radolf 1995, Shevchenko *et al.* 1997) permitiram afirmar que o conteúdo lipídico em cardiolipina estava associado à membrana citoplasmática, assim como se encontrava presente em fracções da membrana externa, explicando a actividade opsonica do anticorpo anti-antígeno VDRL.

Em 1906 Wasserman, Neisser e Bruck (citado por Larsen *et al.* 1995) realizaram pela primeira vez o serodiagnóstico da sífilis ao aplicarem a reacção de fixação do complemento de Bordet-Gengou no diagnóstico da infecção. Na altura, o antígeno utilizado foi obtido a partir de extracto de fígado de feto com sífilis, rico em treponemas. Inicialmente, os investigadores pensaram que o antígeno de Wasserman era específico, mas Landsteiner demonstrou que outros tecidos, sobretudo extracto alcoólico de músculo cardíaco, podiam também, ser utilizados como antígenos (Larsen *et al.* 1995). Este antígeno, não específico, constituído por partículas lipídicas em suspensão, era formado por uma mistura de lípidos tecidulares mais ou menos próxima da que se encontra na membrana dos treponemas. Esta suspensão antigénica, com algumas variantes (purificação dos lípidos: cardiolipina de Mary Pangborn, aperfeiçoamento da técnica de Bordet-Gengou), constituiu até 1949 um dos principais métodos imunológicos de diagnóstico laboratorial de sífilis. À reacção de fixação do complemento foram depois associadas reacções de floculação (Kahn), ou de aglutinação (Kline e VDRL) que utilizavam o mesmo tipo de

antigénio, não tendo por isso sido melhorada a sua especificidade.

Em 1949, foi, pela primeira vez, descrito o teste de Nelson e Mayer (Nelson e Mayer 1949), um teste serológico de diagnóstico que utilizava como antigénio o próprio *T. pallidum* vivo e móvel. Embora de realização difícil, este teste foi uma verdadeira revolução na história da sífilis, por ter introduzido uma reacção específica, que permitia julgar sobre o valor das reacções anteriores, que, com frequência, eram responsáveis por reacções falsamente positivas, surgindo no curso de outras doenças, como as doenças auto-imunes, as parasitoses, as hepatites ou estados fisiológicos como a gravidez. Aquele teste esteve na origem de outras reacções, que surgem 10 a 20 anos mais tarde, o teste de imunofluorescência indirecta e o teste de hemaglutinação. De 1949 a 1959 foi o único teste específico utilizado, até ao aparecimento do teste de imunofluorescência indirecta de Deacon *et al.* (1957 – citado por Larsen *et al.* 1995). Em 1969, Tomizawa e Kazamatsu descreveram uma reacção de hemaglutinação passiva que utilizava antigénio específico e que acaba por ser adaptada como prova de rastreio das treponematoses (Larsen *et al.* 1995). Em 1980 acaba por ser suprimida a técnica de Bordet-Gengou, utilizando-se para o diagnóstico serológico da sífilis uma reacção lipídica por micro-aglutinação (teste não treponémico) e outra treponémica (teste treponémico).

Os métodos de detecção de anticorpos complementam os de detecção de antigénio, utilizados para o diagnóstico do complexo primário e do secundarismo e são os únicos métodos de diagnóstico prático em uso até hoje, para os estádios latentes e tardios.

Os testes serológicos para pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* são divididos em dois grupos com designação derivada do tipo de antigénio utilizado: testes não treponémicos e testes treponémicos.

6.2.1. Testes não treponémicos

Os testes não treponémicos evidenciam anticorpos das classes das imunoglobulinas IgG e IgM que surgem como reacção às substâncias fosfolipídicas libertadas pelas células do endotélio vascular destruídas no decurso da infecção sífilítica, assim como contra a cardiolipina e substâncias

semelhantes a lipoproteínas, componentes estruturais libertados pelos treponemas (Matthews *et al.* 1979, Belisle *et al.* 1994). Estes anticorpos têm sido erradamente designados de reaginas, sendo, actualmente, mais conhecidos por anticorpos anticardiolipina. Os anticorpos anticardiolipina, são produzidos em consequência da infecção por *T. pallidum* ou a outros treponemas, e como resposta a doenças não treponémicas, tais como as doenças agudas ou crónicas com lesão de células teciduais (Catterall 1972), pelo que um teste não treponémico reactivo por si só, não confirma a infecção por *T. pallidum*.

O primeiro teste a ser utilizado para o diagnóstico laboratorial de sífilis foi o já referido teste de fixação do complemento de Wassermann, Neisser e Bruck, a partir do teste introduzido por Bordet e Gengou em 1901 (Tabela 4).

Tabela 4. Cronologia dos testes não treponémicos*

Data	Autor	Teste
1906	Wassermann <i>et al.</i>	Teste de fixação de complemento
1907	Michaelis	Teste de precipitação sem complemento
1922	Kahn	Teste de floculação com complemento
1941	Pangborn	Isolamento e purificação da cardiolipina
1946	Harris <i>et al.</i>	Venereal Disease Research Laboratory (VDRL)
1957	Portnoy <i>et al.</i>	Modificação de VDRL para soro não descomplementado (USR)
1961	Portnoy <i>et al.</i>	Modificação do USR para teste rápido em plasma (RPR)
1980	March e Stiles	Teste de rastreio reaginas (RST)
1983	Pettit <i>et al.</i>	Modificação do URS para teste em soro não descomplementado com vermelho de toluidina
1987	Pedersen <i>et al.</i>	Técnica imunoenzimática ELISA

* Adaptado de Larsen *et al.* 1998

Embora bastante úteis, os testes de fixação do complemento eram muito complicados, pelo que Michaelis, em 1907, utilizando extracto aquoso de fígado sífilítico e Meinick em 1917, utilizando extracto de fígado em água ou em cloreto de sódio, desenvolveram o primeiro teste de precipitação, que não necessitava do complemento (citados por Larsen *et al.* 1995). Mais tarde, em 1922, Kahn introduziu o primeiro teste de floculação sem complemento, o qual podia ser lido macroscopicamente. Estes testes variavam muito em sensibilidade e especificidade, porque os antígenos eram derivados de extractos não purificados, tendo sido Mary Pangborn, que em 1941, ao isolar com sucesso a cardiolipina, iniciou a era da padronização dos testes não treponémicos.

A cardiolipina, associada ao colesterol e à lecitina, forma um antígeno activo para a detecção deste tipo de anticorpos, permitindo a sua padronização, tanto química como serológica. Este facto veio aumentar a reprodutibilidade dos testes, quer no próprio laboratório, quer entre laboratórios.

Com este novo tipo de antígeno foram desenvolvidos microtestes, como o Venereal Disease Research Laboratory (VDRL), os quais devido à comercialização padronizada dos reagentes foram, rapidamente, convertidos em métodos utilizados no rastreio de grande número indivíduos. Com a adição de cloreto de colina e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ao antígeno do VDRL, foi possível aumentar a reactividade do teste e estabilizar a suspensão antigénica (Portnoy *et al.* 1961), de que resultou um teste que não necessitava da descomplementação do soro antes da sua execução, e que podia também ser efectuado em plasma (“unheated serum reagin” - USR). A incorporação de partículas de carvão a este antígeno (Portnoy *et al.* 1957) veio permitir a leitura macroscópica do mesmo. O teste resultante passou a ser designado como teste reagina plasmático rápido (RPR), sendo efectuado em cartões plastificados. Surge então o RPR – “teardrop card test” (Portnoy *et al.* 1962), desenvolvido com a finalidade de rastreio em locais com pouco equipamento laboratorial, já que o “kit” continha todo o material necessário à execução do teste, sendo o plasma obtido de sangue colhido por punção do dedo. No entanto, esta técnica é considerada menos sensível do que a que correntemente se utiliza, com círculos de 18 mm no cartão plastificado (Van Dyck *et al.* 1993). Ao contrário do RPR “teardrop card test”, vocacionado para rastreio no campo, o “RPR – card test” foi

desenvolvido para execução em laboratórios com grande número de amostras. (Falcone *et al.* 1964)

Posteriormente, são efectuadas algumas modificações ao antigénio básico do RPR como a adição de vermelho de toluidina que passou a ser designado por TRUST (Pettit *et al.* 1983), e o teste de rastreio de reagina (RST) que utiliza sudan black B como corante (March *et al.* 1980).

Dos diferentes testes desenvolvidos, os mais utilizados são o VDRL e o RPR, cujo antigénio é uma solução alcoólica padronizada de cardiolipina, colesterol e lecitina purificada, adicionada no caso do RPR, de partículas de carvão que tornam a reacção visível macroscopicamente, ao contrário do primeiro, cuja leitura é possível, apenas, ao microscópio óptico (utilizando objectiva de 10X).

Os testes não treponémicos podem ser utilizados, quer para o rastreio, teste qualitativo, quer como teste quantitativo, para a monitorização da terapêutica (Fiumara 1978, 1979, 1980a, 1980b, Pettit *et al.* 1981, Brown *et al.* 1985, Romanowski *et al.* 1991, Larsen *et al.* 1998).

Nos testes qualitativos é utilizado soro não diluído para verificar a presença ou a ausência de anticorpos. Nos testes quantitativos são efectuadas diluições seriadas do soro até um ponto final em que não há reactividade, sendo o título registado como a mais alta diluição na qual a reactividade é completa. O título de anticorpos dos testes não treponémicos tem sido correlacionado com a actividade da doença (Grasse *et al.* 1999). O título inicial de um teste não treponémico estabelece uma linha de base de reactividade a partir da qual podem ser verificados: infecção recente com a demonstração do aumento em duas diluições no título inicial, re-infecção ou recidiva que pode ser detectada em indivíduos com reactividade persistente (“serofastidiosos”).

Os diferentes tipos de testes apresentam o mesmo nível de sensibilidade e especificidade (Tabela 5). No entanto, apresentam níveis diferentes de reactividade, pelo que a monitorização da terapêutica, cujo sucesso ou fracasso se baseia na diminuição em pelo menos duas diluições a partir do título base do dia da terapêutica, deve ser sempre avaliada, utilizando o mesmo tipo de teste (Larsen *et al.* 1995).

Tabela 5. Quadro de sensibilidade e de especificidade dos testes não treponémicos*

Testes	Sensibilidade – estádios da infecção				Especificidade
	(%)				(%)
	Sífilis primária	Sífilis secundária	Sífilis latente	Sífilis tardia	Sem sífilis
VDRL	78 (74-87)	100	95 (88-100)	71 (37-94)	98 (96-99)
RPR	86 (77-100)	100	98 (95-100)	73	98 (93-99)
VDRL/EIA	90	100	100		98

* Adaptado de Larsen *et al.* (1998)

Um teste RPR tornar-se-á, não reactivo um ano após terapêutica correcta da sífilis recente e após dois anos no estágio de secundarismo (Fiumara 1980a, Brown *et al.* 1985). O tempo necessário para que a reactividade desapareça correlaciona-se com o intervalo de tempo entre o contacto e a instituição da terapêutica (Fiumara 1980a), assim como com a severidade da doença e o tipo de lesões cutâneas do secundarismo. Um indivíduo com exantema macular reverte mais rapidamente para não reactivo do que um com exantema papular (Tramont 1990).

Em 1987, Pedersen *et al.* desenvolveram uma técnica imunoenzimática (EIA) de tipo indirecto em que o antigénio VDRL reveste os micropoços da microplaca. O soro a estudar é, então, adicionado e os anticorpos não treponémicos, quando presentes, vão ligar-se a esse antigénio. Os anticorpos ligados ao antigénio são detectados pela adição de um conjugado anti-humano marcado com uma enzima, a qual, ao reagir com um substrato, desencadeia a reacção colorimétrica que é em seguida lida em espectrofotómetro.

Nos estudos efectuados por aqueles investigadores o teste mostrou uma sensibilidade de 97% em doentes não tratados e especificidade de 97%. Tal como para os outros testes não treponémicos, a reactividade diminui ou desaparece após a terapêutica, apresentando a desvantagem de não permitir

quantificação de reactividade em título essencial para a monitorização do resultado da terapêutica. No entanto, é uma técnica que permite a execução de muitos testes simultaneamente, por ser automatizável.

Embora os testes não treponémicos sejam muito úteis no diagnóstico laboratorial de sífilis, os seguintes problemas podem surgir pela sua utilização: o fenómeno de “prozona”, os resultados falso positivos e a dificuldade na interpretação dos testes.

Nos soros que contêm grande quantidade de anticorpos não treponémicos pode surgir o chamado fenómeno de “prozona”, em que um soro não diluído não apresenta reactividade, enquanto que esta vai surgindo com a diluição do mesmo. Esta reacção surge em cerca de 1 a 2% dos doentes em estágio de secundarismo (Spangler *et al.* 1964, Jurado *et al.* 1993) e deve-se à presença de anticorpos em excesso que bloqueiam ou tornam a reacção antigénio-anticorpo incompleta ou anormal, pelo que, soros que deveriam apresentar uma forte reactividade surgirão como fracamente reactivos, negativos ou com uma reacção granulosa no soro não diluído. Após a diluição, o soro apresenta um aumento na reactividade que diminuirá em seguida até um ponto final de não reactividade. A diluição de 1:16 é geralmente adequada para obter a concentração apropriada de anticorpo e detectar este tipo de reacção.

As reacções falsamente positivas estão dependentes da população estudada. Este tipo de reacções dividem-se em dois grupos: agudas com duração inferior a seis meses e crónicas que persistem por períodos superiores (Larsen *et al.* 1998). As primeiras estão associadas a hepatite viral, sarampo, mononucleose infecciosa, varicela e outras infecções virais, malária, vacinação, gravidez, idade e erros técnicos de laboratório. As reacções falsamente positivas crónicas estão relacionadas com doenças do tecido conjuntivo como lupus eritematoso sistémico, ou com doenças associadas com imunoglobulinas anormais, sendo mais comuns na mulher. Também a utilização de narcóticos injectáveis, a idade (Tuffanelli 1966), a lepra e as doenças malignas podem ocasionar este tipo de reactividade (Larsen *et al.* 1998).

Os títulos das reacções falsamente positivas são, em geral, baixos, embora raramente possam ser extremamente altos, como no caso dos

toxicodependentes injectáveis, os quais apresentam uma percentagem de 10% ou mais com títulos superiores a oito (Larsen *et al.* 1995).

A interpretação do resultado dos testes não treponémicos está dependente da população testada. O valor preditivo do teste aumenta quando associado com teste treponémico reactivo, pelo que ao utilizar-se um teste não treponémico em população de baixo risco todos os testes reactivos devem ser confirmados por um teste treponémico. Nesta população, a reactividade pode estar relacionada com um falso positivo (Larsen *et al.* 1998).

O resultado do teste deve também ser interpretado tendo em conta o estágio da sífilis. Um resultado reactivo ou reactivo fraco pode ser observado em todos os estádios da doença, podendo, também, indiciar um indivíduo serofastidioso (indivíduo que apesar da terapêutica ter sido adequada mantém teste não treponémico reactivo) ou um falso positivo (Larsen *et al.* 1995). Um resultado negativo permite de um modo geral excluir infecção activa, devendo-se ter presente que a não reactividade serológica para teste não treponémico pode ser encontrada no período de incubação da doença, uma vez que os anticorpos não treponémicos só são detectáveis sete a 10 dias após aparecimento da úlcera (Larsen *et al.* 1995). Assim, quando se suspeita de sífilis é importante repetir o teste, já que 15% dos indivíduos com sífilis recente podem não apresentar reactividade inicialmente (Anderson *et al.* 1989). Também, no estágio latente tardio o teste não treponémico pode ser não reactivo (Young 1992a).

A maior parte dos erros de laboratório associados com os testes não treponémicos relacionam-se com a temperatura do laboratório, a amostra e os reagentes. Temperaturas inferiores a 25°C levam à diminuição de reactividade, enquanto que superiores a 29°C a aumentam. Outros erros relacionam-se com amostras hemolisadas, contaminadas ou com aumento de lipídios, o tempo ou a velocidade de rotação inadequada e incorrecta descarga de antigénio (Kennedy e Creighton 1998a, Larsen e Creighton 1998).

6.2.2. Testes treponémicos

Os testes treponémicos pesquisam anticorpos específicos porque utilizam *T. pallidum* ou algum dos seus componentes como antigénio, sendo utilizados,

sobretudo, para confirmar a reactividade dos testes não treponémicos.

São testes de execução mais difícil e mais caros que os não treponémicos, pelo que, em regra não são utilizados para o rastreio, mantendo-se reactivos pelo resto da vida do doente, mesmo após terapêutica correcta, não sendo, por isso, utilizados para a sua monitorização.

As primeiras tentativas para utilizar treponemas como antígeno foram efectuadas por Nelson e Mayer em 1949, que desenvolveram o primeiro teste de pesquisa de anticorpos específicos, o teste de imobilização de *T. pallidum* (TPI). Este baseava-se na capacidade dos anticorpos existentes no soro do doente, em presença de complemento, serem capazes de imobilizar treponemas vivos quando observados ao microscópio de fundo escuro.

Embora de realização difícil, este teste originou verdadeira revolução na história da sífilis, porque, finalmente, se encontrou uma reacção específica, que além disso permitia julgar o valor das técnicas existentes. Esteve também na origem das técnicas que surgiram 10 a 20 anos mais tarde, como o teste de imunofluorescência indirecta e o teste de hemaglutinação passiva.

No entanto, tratava-se de uma técnica complicada, difícil do ponto de vista técnico, necessitando de treponemas vivos e móveis que não podendo ser cultivados em meios artificiais eram mantidos por cultura “in vivo” de *T. pallidum* da estirpe de Nichols, com passagens intratesticulares, de oito em oito dias, no coelho. Assim, tornava-se uma técnica demorada e cara, apresentando ainda o risco de contaminação dos técnicos de laboratório, pelo que foram desenvolvidos mais tarde outros testes (Tabela 6) de maior ou menor popularidade.

Na altura, o TPI obteve rápida aceitação, e apesar da sua complexidade, custo, dificuldade na reprodutibilidade e necessidade de animais, foi uma técnica muito utilizada até cerca de 1980, sobretudo para resolver resultados conflituosos, tendo acabado por ser substituída pela técnica de imunofluorescência indirecta (Wicher *et al.* 1999).

Tabela 6 -Cronologia dos testes treponémicos*

Data	Investigadores	Tipo de Teste
1949	Nelson e Mayer	Teste de Imobilização de <i>Treponema pallidum</i>
1953	D'Allesandro e Dardanoni	Teste de fixação de complemento de Reiter
1957	Deacon <i>et al.</i>	Teste de imunofluorescência
1964	Hunter <i>et al.</i>	Teste de imunofluorescência modificado por absorção
1965	Rathlev	Teste de hemaglutinação
1969	Cox <i>et al.</i>	Teste de hemaglutinação em microplaca
1975	Veldekamp e Visser	Teste imunoenzimático (EIA)
1982	Hanff <i>et al.</i>	Aplicação técnica de Western blot ao diagnóstico de sífilis
1989	Schouls <i>et al.</i>	Utilização primeiros antígenos clonados no serodiagnóstico de sífilis

*Adaptado de Larsen *et al.* (1998)

6.2.2.1. Teste de imunofluorescência indirecta (Fluorescent Treponema Antibody Absorbed - FTA-Abs)

Um dos maiores avanços nos testes treponémicos foi o desenvolvimento da técnica de fluorescência em 1957 por Deacon *et al.* O procedimento original utilizava diluição a 1:5 do soro do doente que reagia com uma suspensão de treponemas mortos, mas apresentava cerca de 25% de reacções inespecíficas em soros normais (Wallace e Norris 1969). Para a eliminação das reacções inespecíficas passou a diluir-se o soro a 1:200 (Deacon *et al.* 1960), o que aumentou a especificidade, mas tornou o teste pouco sensível. Como as reacções inespecíficas eram devidas à presença de antígenos comuns entre *T. pallidum* e os treponemas não patogénicos que podem existir na flora humana normal, Deacon e Hunter em 1962 desenvolveram uma técnica que remove os

anticorpos inespecíficos por absorção dos soros a estudar, com treponemas de Reiter preparados a partir de culturas sonicadas, tendo conseguido melhores especificidade e sensibilidade com o teste que designaram por “Fluorescent Treponemal Antibody Absorbent” (FTA-Abs).

No FTA-Abs é utilizado *T. pallidum* estirpe de Nichols, como antigénio, e o soro do doente, diluído em absorvente (constituído por extractos de treponema de Reiter) é colocado em contacto com os treponemas fixados na lâmina. A presença da ligação antigénio-anticorpo, quando existem anticorpos no soro, é, em seguida, evidenciada pela utilização de um anticorpo anti-humano conjugado com fluoresceína, o que resulta em treponemas fluorescentes, quando observados ao microscópio de fluorescência.

O FTA-Abs em infecções recentes apresenta uma sensibilidade de 70 a 100%, sendo positivo em 100% dos casos de secundarismo e reactivo em 96 a 100% dos estádios de sífilis tardia (Lukehart *et al.* 1988, Larsen *et al.* 1998). A reactividade do FTA-Abs persiste mesmo após terapêutica adequada, embora por vezes se possa tornar não reactivo se a terapêutica tiver sido instituída precocemente na evolução da doença (Young 1992a). A especificidade do teste encontra-se entre 92% a 99% (Hunter *et al.* 1986).

O FTA-Abs apresenta algumas desvantagens, como o facto da sua interpretação ser subjectiva, de necessitar de pessoal treinado para a sua observação, e da padronização do teste ser difícil de um laboratório para o outro. A sua principal aplicação tem sido na diferenciação dos resultados de falsa reactividade dos testes não treponémicos e para estabelecer o diagnóstico de sífilis latente ou de sífilis tardia (George *et al.* 1998b). Um teste FTA-Abs reactivo sugere infecção actual ou passada com treponema patogénico, enquanto que um teste FTA-Abs não reactivo com um teste não treponémico reactivo sugere uma reacção de falsa reactividade deste último.

Esta técnica tem sido aplicada à pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* no liquor para diagnóstico de neurosífilis, efectuando-se diluição com o absorvente de 1:5 (FTA-Abs –LCR). O teste FTA-Abs-LCR mostrou ser mais sensível que o VDRL-LCR (Larsen e Johnson 1998), embora o significado clínico dessa reactividade seja difícil de estabelecer por o mesmo se manter reactivo em doentes com sífilis recente ou sífilis latente adequadamente tratados (Jaffe *et al.*

1978b). No entanto, um resultado negativo parece poder excluir o diagnóstico de neurosífilis (Jaffe *et al.* 1978b, Luger *et al.* 1988, Marra *et al.* 1995).

6.2.2.2. Testes de aglutinação

Rathlev *et al.* (1965) foram os primeiros a aplicar a técnica de aglutinação passiva (hemaglutinação) à pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum*, tendo utilizado como antígeno eritrócitos de carneiro sensibilizados com extractos sonicados de *T. pallidum*, estirpe de Nichols. A técnica original, Teste de Hemaglutinação Passiva (TPHA) era efectuada em tubo, tendo sido posteriormente modificada (Cox *et al.* 1969) para execução com pequenos volumes em microplaca (MHA-TP). Diversas variações da técnica, utilizando eritrócitos de peru, carneiro e galinha estão actualmente comercializados, e em todas elas são utilizadas células não sensibilizadas, para controlo das reacções inespecíficas.

A presença de anticorpos no soro do doente é observada pela aglutinação dos eritrócitos sensibilizados, com formação de uma malha ou rede dos mesmos, cobrindo o micropoço, enquanto que os resultados não reactivos são definidos pela formação de um botão compacto no fundo do micropoço.

A técnica permite definir os resultados de modo qualitativo (reactivos, não reactivos ou indeterminados) ou quantitativo. A maior parte dos estudos efectuados não tem demonstrado relação prática entre o título e o estágio da doença e ao contrário dos testes não treponémicos não é um teste útil para a monitorização terapêutica (Cox *et al.* 1971, Johnston 1972a, Buist *et al.* 1973).

O teste de hemaglutinação em microplaca (MHA-TP) tem sido utilizado, sobretudo, para confirmar a reactividade dos testes não treponémicos (Jaffé 1975, Jaffé *et al.* 1987). Tem a vantagem de ser mais fácil de executar do que o teste FTA-Abs e embora seja tão específico como aquele, é menos sensível na sífilis primária (Fiumara 1980a).

A origem de erros de laboratório, para este tipo de técnica, relaciona-se, sobretudo, com a utilização de placas sujas com pó, erros na pipetagem e vibrações no laboratório que podem alterar o padrão da aglutinação.

Várias tentativas de automatização deste teste foram ensaiadas, sobretudo,

para a sua utilização em bancos de sangue. Uma dessas técnicas designa-se por Olympus PK-TP e utiliza eritrócitos de galinha, os quais após fixação são sensibilizados com componentes sonicados de *T. pallidum*. Dos estudos efectuados (Forbes *et al.* 1991) concluiu-se que a técnica era pelo menos tão específica como o RPR em cartão.

A utilização de eritrócitos com portadores de antigénio *T. pallidum* pode resultar em reacções heterófilas, pelo que investigadores da companhia comercial Fujirebio Inc. produziram um novo teste de aglutinação passiva que utiliza uma preparação liofilizada de partículas de gelatina coloridas como portadoras do antigénio *T. pallidum*. O princípio e execução do teste são semelhantes ao teste de hemaglutinação em placa. Quando presentes no soro, os anticorpos anti-*T. pallidum* irão reagir com as partículas sensibilizadas com estirpe de Nichols, formando um véu de partículas de gel aglutinadas nos poços da microplaca. Os primeiros estudos efectuados com o teste (Kobayashi *et al.* 1983, Degushi *et al.* 1994) demonstraram que o teste TP.PA parecia superior ao TPHA na detecção dos casos de sífilis recente. Estudos posteriores, confirmaram esse achado, sugerindo-o como apropriado substituto do TPHA (Pope *et al.* 2000, Young *et al.* 2000)

Problemas encontrados com os testes treponémicos

Dos testes mais utilizados, o FTA-Abs e o TPHA, o que origina mais resultados falso positivos é o FTA-Abs (Jaffé *et al.* 1978a, Wentworth *et al.* 1978 Larsen *et al.* 1981).

Embora se possam encontrar resultados de falsa reactividade transitórios, de origem desconhecida, a maioria destes resultados originados com o teste treponémico FTA-Abs estão associados a doenças do sistema conjuntivo (Shore e Faricelli 1977, Anderson e Stillman 1978), como a variedade de lúpus eritematoso induzido por drogas (Kraus *et al.* 1971), mas também em doentes com anemia hemolítica auto-imune (Mackey *et al.* 1969) e nas grávidas (Buchanan e Haserick 1970). Para ultrapassar esse tipo de reacções procede-se à absorção com ADN de timo de vitela, para remoção dos anticorpos anti-ADN no soro (Kraus *et al.* 1971) Resultados falsamente reactivos inexplicáveis são

por vezes também observados nos idosos. Outras causas são a deficiente absorção na remoção dos anticorpos formados, que originam reactividade cruzada (Hunter *et al.* 1986, Magnarelli *et al.* 1990).

Com a técnica de hemaglutinação, os resultados falso positivos são, em regra, inferiores a 1%, embora se possam observar resultados incoerentes em doentes com mononucleose infecciosa, sobretudo na presença de altos títulos de anticorpos heterófilos (Johnston 1972a). Um teste de hemaglutinação com resultados de falsa reactividade pode ocorrer, também, em doentes com doenças do colagénio, lepra e em toxicodependentes (Wentworth *et al.* 1978, Rein *et al.* 1980, Larsen *et al.* 1981). Muitas vezes, os resultados são difíceis de diferenciar, já que a sífilis pode coexistir com aquelas condições. No entanto, uma amostra reactiva por técnica de FTA-Abs ou TPHA pode, em 95% dos casos, ser considerada como correspondendo a infecção passada ou actual (Rein *et al.* 1980). Os testes treponémicos variam a sua reactividade em relação à condição clínica, apresentando-se não reactivos durante o período de incubação. Reactivam na fase de sífilis recente, durante a qual a reactividade varia, dependendo do tempo decorrido entre desenvolvimento da lesão e a colheita de amostra para o estudo serológico (Tabela 7), mantendo-se depois reactivos durante anos com ou sem terapêutica.

Tabela 7. Quadro de sensibilidade e especificidade de testes treponémicos*

Teste	Sensibilidade (%)				Especificidade (%)
	Estádio de infecção não tratada				
	Primário	Secundário	Latente	Tardio	
FTA-Abs	70-100	100	100	96	94-100
MHA-TP	69-90	100	97-100	94	98-100
FTA-Abs DS	69-93	100	100		97-100
ELISA-47kDa	90	100	100		94
Western-blot	90	100	100		98

*Adaptado de Larsen e Johnson (1998)

No diagnóstico de sífilis tardia, não tratada, um teste treponêmico reactivo pode ser a única indicação de infecção treponêmica prévia. Após tratamento adequado, os testes treponêmicos mantêm-se reactivos em 85% dos casos durante muitos anos e em alguns indivíduos durante toda a vida (Schroeter *et al.* 1972)

6.2.2.3. Técnicas imunoenzimáticas

As técnicas imunoenzimáticas têm sido, também, aplicadas à pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum*. Os primeiros a aplicar o princípio da técnica foram Veldkamp e Visser (1975). Subsequentemente, diversos testes, tendo como base a mesma técnica e utilizando extractos de *T. pallidum* estirpe de Nichols, foram desenvolvidos e avaliados (Pope *et al.* 1982, Farshy *et al.* 1985, Ijsselmuiden *et al.* 1987, Burdash *et al.* 1987, Lefevre *et al.* 1990, Nayar e Campus 1993, Hooper *et al.* 1994, Backhouse e Hudson 1995).

De um modo geral, esses testes utilizam microplacas de fundo liso revestidas com antígeno *T. pallidum* sonicado. O soro é colocado em contacto com o antígeno e a presença de anticorpos é evidenciada pela utilização de anticorpo anti-humano marcado com enzima ou biotina, os quais, ao reagirem com um substrato, produzem uma reacção colorimétrica observável e lida em espectrofotómetro. Os resultados obtido são de tipo qualitativo com informação de reactivo, não reactivo e indeterminado. Quando estudada a sua sensibilidade foram obtidos valores de 98,3% a 100%, independentemente do estágio da sífilis (Young *et al.* 1992b, Nayar e Campus 1993, Hooper *et al.* 1994, Backhouse e Hudson 1995).

Na sequência deste tipo de testes foram desenvolvidos outros baseados em antígenos clonados, sendo uma das primeiras proteínas a ser clonada e utilizada no diagnóstico de sífilis a proteína TmpA (Schouls *et al.* 1989). Esta é uma lipoproteína provavelmente localizada na membrana e associada com outra proteína de membrana a TmpB. A proteína TmpA foi utilizada como antígeno na técnica EIA (Ijsselmuiden *et al.* 1987, Schouls *et al.* 1989), resultando num teste com boa sensibilidade e especificidade e de resultados semelhantes às técnicas MHA-TP e FTA-Abs. Outras proteínas recombinantes foram

desenvolvidas com a finalidade de serem utilizadas no diagnóstico imunoenzimático de sífilis, entre elas a proteína de 47-kDa, com a qual foi comercializado um teste de EIA de tipo indirecto com o nome de “Spirotek syphilis”. O teste utiliza placas revestidas com a proteína 47-kDa recombinante (Pope e Fears 1998). Os anticorpos do soro do doente reagem com o antígeno e são detectados por imunoglobulina anti-humana biotinilada marcada com estreptavidina peroxidase, com formação de uma reacção colorida. A intensidade da cor é proporcional aos níveis de anticorpo presentes no soro. O teste apresentou sensibilidade superior à dos outros testes treponémicos, sobretudo no diagnóstico de sífilis recente não tratada.

Um outro teste imunoenzimático, utilizando o princípio de imunocaptura (Young *et al.* 1998) foi desenvolvido e comercializado com a designação de “ICE Syphilis” e recomendado como teste de rastreio. Este utiliza como antígeno três proteínas recombinantes de *T. pallidum* (TpN15, TpN17 e TpN47). A avaliação demonstrou que a técnica foi mais sensível e específica que a técnica semelhante que utiliza como antígeno *T. pallidum* sonificado e mais sensível que a técnica de FTA-Abs.

Embora pouco práticas e de custo elevado para o estudo de pequeno número de amostras, as técnicas imunoenzimáticas apresentam a grande vantagem de serem automatizáveis, permitindo o processamento de grande número de amostras simultaneamente. Ao mesmo tempo elimina-se a leitura subjectiva das técnicas TPHA e FTA-Abs, uma vez que é efectuada em espectrofotómetro.

6.2.2.4. Técnicas de Western-blot

Os métodos de imunoblot são presentemente considerados como técnicas de rotina no diagnóstico laboratorial, tendo sido propostos como testes de confirmação para a infecção a *T. pallidum* (Dettori 1989, Byrne *et al.* 1992, Meyer *et al.* 1994), visto que os outros testes serológicos ocasionarem falsas reacções em várias condições clínicas.

Foi graças aos trabalhos de biologia molecular sobre *T. pallidum* subespécie *pallidum*, estirpe de Nichols, que se conheceu melhor a sua estrutura antigénica. Em 1981, Pedersen e colaboradores utilizaram uma técnica de

contra-imunoelectroforese para identificar quatro antígenos de *T. pallidum* que reagissem com anticorpos do soro de um doente na fase de secundarismo da sífilis. Lukehart *et al.* (1982), utilizando, também, uma técnica de Western blot identificaram oito identidades antigénicas, das quais três reagem com anticorpos treponémicos. Com a mesma técnica, Hanff *et al.* (1982) identificaram pelo menos 22 polipeptídeos e caracterizaram a resposta humoral de um soro sífilítico humano, demonstrando no coelho a cinética de aparecimento desses anticorpos. Após o 3º dia de inoculação e por técnica de Western blot evidenciaram a presença de anticorpos dirigidos contra duas proteínas de peso molecular, 60 kd e 46 kd. Ao 19º dia o número de anticorpos dirigidos aos antígenos do treponema aumentou indo até 22 (com peso moleculares entre 94 kd e 14,4 kd), ficando então estáveis, o que parece constituir a resposta humoral máxima.

Nos vários estudos efectuados, pelo menos nove proteínas de *T. pallidum* com peso molecular de 15 (TpN15), 17 (TpN17), 33, 37 (TpN37), 39, 43, 45 (TnpA), 47 (TpN47), e 97 kDa foram identificados com as maiores determinantes imunogénicas, (Wicher *et al.* 1986, 1987, Norris *et al.* 1993, Blanco *et al.* 1994; Radolf *et al.* 1995a, George *et al.* 1998c), dos quais os TpN15, TpN17, TpN37, TnpA e TpN47 (Larsen *et al.* 1995, George *et al.* 1998c, Marangoni *et al.* 1999, Sambri *et al.* 2001b) provaram apresentar relevância diagnóstica.

O método de Western blot baseia-se na separação das proteínas a partir de extracto de *T. pallidum* fervido em sulfato de dodecil de sódio (SDS) por electroforese em gel de gradiente de poliacrilamida. Após a separação, as proteínas são transferidas electroforéticamente para uma folha de nitrocelulose, a qual é, em seguida, cortada em tiras que são incubadas com o soro a estudar. A presença de anticorpos é detectada pela utilização de um segundo anticorpo anti-humano marcado com uma enzima, ao qual se segue adição de substrato para visualização da reacção. Quando os anticorpos para *T. pallidum* estão presentes, há formação de reacção colorida com o aparecimento de bandas características na tira da membrana de nitrocelulose.

Actualmente, muitos investigadores concordam que a presença de anticorpos reactivos com os componentes de *T. pallidum* de massas molecular de TpN 15 (15.5 kda), TpN 17 (17kda), TnpA (45 kda), e TpN 47 (47 kDa) permite

confirmar o diagnóstico de sífilis (Norris *et al.* 1993, George *et al.* 1998c). Anticorpos dirigidos a, pelo menos, três dessas proteínas são necessários para considerar o soro reactivo.

Alguns grupos de investigadores têm referido o interesse da utilização de proteínas recombinantes para Western blot (Strugnell *et al.* 1990, Sambri *et al.* 2001b). A produção de antígenos recombinantes permite a produção e a caracterização de proteínas antigénicas específicas e individuais em quantidades ilimitadas, tornando o processo mais simples e barato.

Sambri *et al.* (2001b) efectuaram um estudo de diagnóstico serológico de sífilis utilizando técnica de Western blot com proteínas recombinantes (rTpN47, rTnpA, rTpN37, rTpN17, rTpN15). Estudaram 450 soros, 200 de dadores de sangue, 200 de doentes com sífilis em diferentes estádios e 50 de potencial reactividade cruzada, gravidez, ou outras infecções treponémicas e doenças auto-imunes. Comparando aquele com o teste TPHA e com o teste de Western blot de lisado total, concluíram que a técnica Western blot utilizando antígeno recombinante poderia substituir a técnica de Western blot efectuada com o extracto total, visto que apresentava boa sensibilidade e especificidade. Por outro lado, as tiras apresentavam menos imunodeterminantes, o que permitiu a leitura e interpretação mais fácil, constituindo um método simples de confirmação na detecção de anticorpos anti-*T. pallidum* no soro. Devido à sua alta sensibilidade associada à simplicidade e objectividade, o teste tem sido considerado como teste de confirmação, podendo ser efectuado quer em soro quer em plasma.

6.2.2.5. Testes rápidos para pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum*

Desde há uns anos têm sido desenvolvidos e avaliados testes treponémicos designados com o nome de testes rápidos para diagnóstico de sífilis. Trata-se de testes de execução simples e leitura fácil, adequados para serem utilizados em centros de saúde de cuidados primários, executáveis por pessoal técnico com um mínimo de treino e não requerendo equipamento especializado.

Estes testes utilizam como antígenos as proteínas recombinantes de *T. pallidum* TpN47, TpN15 e TpN17, associados ou isoladamente. Essas proteínas

podem encontrar-se ligadas a um suporte sólido constituindo um ensaio de imunocromatografia ou ligadas a partículas de látex, constituindo um teste de aglutinação, podendo ser utilizados para a pesquisa de anticorpos no soro, plasma e sangue total. São geralmente testes com leitura em cinco a 20 minutos.

Numa avaliação preliminar de um teste protótipo deste género, que utilizava como antigénio TpN47, Zarakolu *et al.* (2002), demonstraram que o teste foi mais sensível e específico que o teste RPR, sendo não reactivo em todos os soros que tinham apresentado resultados de falsa reactividade pelo teste RPR. Este tipo de testes foi também avaliado no programa “Sexually Transmitted Diseases Diagnostic Initiative (SDI)” incluído no “UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)” da Organização Mundial de Saúde “TDR/SDI/DE (2003). Nesse estudo (WHO 2003), foram avaliados seis tipos de testes rápidos, que utilizavam um ou mais antigénios treponémicos recombinantes, os quais apresentaram um bom rendimento quando comparados com os testes TPHA e TP.PA. A Avaliação de um teste comercializado com o nome de “Determine Syphilis *Treponema pallidum* -Abbot” foi, também efectuada, por Sato *et al.* (2003) e Diaz *et al.* (2004). Nos dois estudos foi determinada a sensibilidade e especificidade do teste. Estas foram de 93,6% e 92,5% no primeiro estudo, enquanto que os segundos autores obtiveram em indivíduos com infecção pelo VIH (198) sensibilidade de 96,2 a 99,2% e de 94,4 a 96,3% em não infectados por aquele vírus (127), tendo a especificidade sido de 92,4 a 95,5% entre os primeiros e de 97,2 a 100% na segunda população (não infectados pelo VIH).

6.2.3. Pesquisa de Anticorpos anti *T. pallidum* do tipo IgM

Uma vez que o serodiagnóstico da sífilis congénita põe sérios problemas, devido à transferência passiva de anticorpos da mãe ao filho, pensou-se que a pesquisa de anticorpos de tipo IgM específicos, que não atravessam a barreira placentária e podem ser sintetizados pelo feto após os três meses, como resposta à infecção, seriam de extrema utilidade. Aos testes citados anteriormente foram efectuadas algumas variações, com a finalidade de pesquisar anticorpos anti-*T. pallidum* de

tipo IgM, com vista a melhorar o diagnóstico laboratorial da sífilis congénita. Um dos primeiros testes descritos foi o FTA-Abs-M (Scotti e Logan 1968) semelhante ao FTA-Abs – G, que utilizava como conjugado um anticorpo anti-IgM. A técnica mostrou-se inespecífica e pouco sensível (Johnson 1972, Kaufman *et al.* 1974, Muller 1986). A especificidade na pesquisa de anticorpos de tipo IgM tem sido posta em causa, devido ao facto do recém-nascido poder produzir esta classe de anticorpos, em resposta à própria transferência passiva de anticorpos de tipo IgG maternos (factor reumatóide e anticorpos anti-idioptáticos), mais do que como resposta à própria infecção (Mayer e Malan 1989). Alguns investigadores procuraram eliminar este facto, através do FTA-Abs 19S IgM (Muller 1986), de modo a excluir todas as imunoglobulinas de tipo G livres ou ligadas à IgM (factor reumatóide) no soro. Essa eliminação pode ser obtida por passagem do soro através de uma coluna contendo proteína G, de modo que a fracção rica em IgM é depois identificada com a utilização de um anticorpo específico IgM conjugado. Reacções falsamente positivas podem, ainda, ser observadas, mas são raras. O teste carece de sensibilidade (Stoll *et al.* 1993), pelo que apesar de o FTA-Abs 19S M ser útil no diagnóstico de sífilis congénita não permite substituir uma cuidadosa e repetida observação clínica associada a um teste não treponémico quantitativo seriado, como forma de avaliação dos recém-nascidos com possível sífilis congénita.

Também, as técnicas imunoenzimática e de Western blot têm sido investigadas para pesquisa de anticorpos de tipo IgM a utilizar neste diagnóstico, sendo idênticas às utilizadas para pesquisa de IgG, excepto de que o conjugado IgM substitui o conjugado IgG (Ijsselmuiden *et al.* 1989a, Lefever *et al.* 1990, Meyer *et al.* 1994, Sanchez *et al.* 1989). Uma técnica imunoenzimática específica desenvolvida para a detecção de anticorpos específicos de tipo IgM foi comercializada com a designação de CAPTIA Syphilis M. Nesta, as placas utilizadas estão revestidas com um anticorpo anti-humano específico de cadeia μ . Este liga-se indiscriminadamente a qualquer anticorpo IgM presente no soro. Os anticorpos específicos para *T. pallidum* irão, quando presentes, ser evidenciados pela adição de um antígeno obtido a partir de extractos de *T. pallidum* (Nichols) que reage com os anticorpos de tipo IgM específicos. Em seguida, essa reacção é evidenciada pela adição de anticorpo anti-*T. pallidum*

monoclonal conjugado com uma enzima que ao reagir com substrato cromogêneo produz reacção colorida visível com leitura no espectofotómetro. O teste apresentou sensibilidade, em recém-nascidos sintomáticos, semelhante ao FTA-Abs 19 S e uma especificidade mais elevada (Leferve *et al.* 1990, Ijsselmuiden *et al.* 1989a, Stoll *et al.* 1993), tendo sido também utilizado para detecção de IgM na sífilis recente. A sensibilidade foi nesse caso de 94% na sífilis primária, 85% no secundarismo e de 82% na sífilis latente recente (Leferve *et al.* 1990). A diminuição na sensibilidade deve-se ao desaparecimento dos anticorpos específicos de tipo IgM no decurso da doença.

6.2.4. Métodos para detecção de anticorpos no liquor

O único teste padronizado para ser utilizado no liquor é o VDRL (Larsen e Johson 1998), o qual deverá ser limitado às amostras de liquor de doentes com testes treponémicos reactivos no soro. O VDRL é muito específico, mas bastante insensível em alguns tipos de neurosífilis (Larsen *et al.* 1985, Marra *et al.* 1995). O FTA-Abs tem também sido adaptado para ser utilizado para estudo no liquor (Jaffe *et al.* 1978b). Ao contrário do VDRL é bastante sensível, e quando não reactivo é utilizado para excluir o diagnóstico de neurosífilis (Jaffe *et al.* 1978b, Marra *et al.* 1995).

6.2.5. Diagnóstico laboratorial nos diferentes estádios clínicos

Apesar do grande número de testes existentes para o diagnóstico laboratorial da sífilis, este apresenta-se ainda problemático, sobretudo quando relacionado com complexo primário, sífilis latente, neurosífilis e sífilis congénita, assim como na co-infecção *T. pallidum*-VIH em utilizadores de drogas injectáveis e em doentes com infecções a microrganismos que apresentam reactividade cruzada.

O Centers for Disease Control, definiu critérios para o diagnóstico da sífilis, que se dividem em três categorias: diagnóstico definitivo, diagnóstico presuntivo e diagnóstico sugestivo, os quais, se encontram resumidos nas Tabela 8 para sífilis precoce e Tabela 9 para sífilis tardia (Larsen *et al.* 1998).

Tabela 8. Critérios de diagnóstico de sífilis precoce*

Complexo primário (sífilis primária)

Diagnóstico definitivo

Exame microscópico directo: identificação de *T. pallidum* em amostras das úlceras, no aspirado do glânglio linfático ou no de biopsia

Diagnóstico presuntivo (1 associado a 2 ou 3)

1. Lesão típica
2. Teste não treponémico ou treponémico reactivo sem história de sífilis
3. Indivíduo com história de sífilis e com aumento em duas diluições no título de teste não treponémico actual em relação a teste do passado

Diagnóstico sugestivo (requer 1 e 2)

1. Lesão semelhante úlcera do complexo primária sífilítico
 2. Contacto sexual nos 90 dias anteriores com indivíduo com sífilis recente ou secundarismo ou sífilis latente precoce.
-

Sífilis secundária

Diagnóstico definitivo

Exame microscópico directo: identificação de *T. pallidum* em amostras de lesão, aspirado de glânglio linfático ou de biopsia de lesão

Diagnóstico presuntivo (1 associado a 2 ou 3)

1. Lesões típicas de sífilis secundária da pele ou mucosas
 - a) Macular, papular, folicular ou pustular
 - b) Condilomas planos – (região anogenital, ou da boca)
 - c) Lesões mucosas (orofaringe ou colo cervical)
2. Teste não treponémico título \geq a 8, teste treponémico reactivo e sem história de sífilis
3. Indivíduo com história de sífilis e aumento em duas diluições no título de teste não treponémico actual em comparação com o título do passado

Diagnóstico sugestivo (1 associado a 2 e apenas quando não é possível efectuar testes serológicos)

1. Presença de manifestações referidas anteriormente
 2. Contacto sexual nos últimos seis meses com indivíduo com sífilis recente
-

Sífilis latente precoce

Diagnóstico definitivo

Não é possível porque as lesões não estão presentes no estágio de latência

Diagnóstico presuntivo (1 e 2 associados a 3 ou 4)

1. Ausência de sintomas e sinais
2. Teste não treponémico e treponémico reactivos
3. História clínica de teste não treponémico não reactivo no ano anterior
4. Aumento em duas diluições no título de teste não treponémico quando comparado com teste anterior em indivíduo com história de sífilis ou história de sintomas compatíveis com sífilis precoce

Diagnóstico sugestivo (1 associado a 2)

1. Teste não treponémico reactivo
 2. História de contacto sexual no ano anterior.
-

* Adaptado de Larsen *et al.* (1998)

Tabela 9. Critérios de diagnóstico de sífilis tardia*

Sífilis benigna e cardiovascular
<u>Diagnóstico definitivo</u> Exame microscópico directo: identificação de <i>T. pallidum</i> em amostras de biopsia tecidual por técnica de imunofluorescência
<u>Diagnóstico presuntivo</u> 1. Teste treponémico reactivo 2. Desconhecimento de terapêutica para sífilis 3. Sintomas característicos de sífilis benigna ou de sífilis cardiovascular
Neurossífilis
<u>Diagnóstico definitivo</u> (requer associação de 1 e 2 ou 3) 1. Teste treponémico reactivo no soro 2. VDRL no liquor reactivo 3. Identificação de <i>T. pallidum</i> no liquor ou em biopsia tecidual por observação microscópica ou inoculação em animal
<u>Diagnóstico presuntivo</u> (requer associação de 1 e 2 ou 3) 1. Teste treponémico reactivo no soro 2. Manifestações clínicas de neurossífilis 3. Aumento de proteínas ou células no liquor na ausência de outra causa conhecida

* Adaptado de Larsen *et al.* (1998)

Período de incubação

Aproximadamente 30% dos indivíduos que tiveram contactos sexuais com um indivíduo infectado por *T. pallidum* irão infectar-se (Sparling 1990). No entanto, com nenhum dos testes referidos é possível detectar a infecção por *T. pallidum* no período de incubação, embora Marfin *et al.* (2001), ao utilizar uma técnica de PCR tendo como alvo o gene da ADN polimerase I, tenham obtido amplificação em quatro dos oito doentes considerados em período de incubação. Por esta razão, é recomendado efectuar terapêutica a todos os doentes com exposição conhecida a indivíduos com sífilis nos 90 dias anteriores, mesmo sem diagnóstico de infecção por *T. pallidum* (CDC 1991b).

Sífilis primária

A detecção directa de *T. pallidum*, um teste não treponémico quantitativo, informação histórica relativamente a terapêutica para sífilis e o diagnóstico de sífilis num parceiro sexual recente, são as informações chave necessárias para o diagnóstico de sífilis primária. A utilização da microscopia de fundo escuro, e de um teste não treponémico, permite o diagnóstico imediato e iniciar terapêutica, assim como a notificação do parceiro sexual logo na consulta inicial. A observação de *T. pallidum* em exsudado de úlcera genital ou extra-genital é sinónimo de diagnóstico definitivo de sífilis. A técnica de imunofluorescência directa pode ser útil quando o exame em fundo escuro não é possível ou é inespecífico, como no caso das lesões orais.

A amplificação do ADN por técnica de PCR, além de possibilitar a identificação do microrganismo, permite, também, o diagnóstico diferencial com outros agentes de úlcera genital que muitas vezes podem coexistir (Orle *et al.* 1996).

Um teste não treponémico não reactivo associado a uma observação microscópica positiva deve-se geralmente a um atraso na resposta immune (Sparling 1999). Um teste não treponémico reactivo num doente não tratado ou um aumento em duas diluições no título de um teste não treponémico, num individuo com história prévia de terapêutica para a sífilis pode ser considerado como diagnóstico presuntivo de sífilis recente, se *T. pallidum* não foi detectado na úlcera ou se o próprio exame não foi efectuado (CDC 1998). Uma vez que a detecção directa do agente e os testes serológicos podem ser insensíveis na fase precoce da sífilis recente, aqueles devem ser repetidos num período de duas a 12 semanas, para exclusão do diagnóstico de sífilis. A serologia para pesquisa de anticorpos apenas se apresenta positiva em 30% dos casos quando se utiliza o teste VDRL, ou 50% dos casos com o teste FTA-Abs, ELISA ou Western-blot, duas a três semanas após a infecção (Larsen *et al.* 1995). Nesta fase devido à menor sensibilidade do teste de hemaglutinação é recomendada a pesquisa de anticorpos pelo FTA-Abs (Jaffe *et al.* 1978a, Wentworth *et al.* 1978, Shore 1967, Dyckman *et al.* 1980).

Sífilis secundária

O estadio secundário surge, em geral, seis a oito semanas após o início de uma infecção não tratada. Quando a doença atinge este estágio, todos os testes são reactivos atingindo sensibilidade de 100%, podendo também observar-se treponemas nas lesões. A presença do microrganismo pode ser evidenciada por técnicas microscópicas e por técnicas de biologia molecular, como a técnica da PCR. Tal como na sífilis recente a utilização da microscopia de fundo escuro e dos testes não treponémicos permite o diagnóstico rápido, iniciar, de imediato, a terapêutica e notificar o parceiro sexual na visita clínica inicial. Um diagnóstico presuntivo de sífilis secundária baseia-se na presença de lesões típicas e de um teste não treponémico com título superior ou igual a 1:8 em indivíduos sem história prévia de sífilis, ou no caso desta ter existido, um aumento em duas diluições relativamente ao mais recente título anterior de um teste não treponémico.

O título nos testes serológicos pode ser maior nos doentes com co-infecção por VIH, mas a escolha e a interpretação dos testes para o diagnóstico de sífilis secundária são os mesmos, quer exista ou não co-infecção por VIH (Rolfs *et al.* 1997).

T. pallidum foi detectado no liquor de uma minoria de indivíduos com e sem infecção por VIH e sífilis secundária. O exame de rotina do liquor não é recomendado na ausência de sintomas neurológicos nestes doentes (Rolfs *et al.* 1997).

Sífilis latente

Por definição, nesta fase estão ausentes sintomas e sinais de infecção, pelo que para se detectar infecção latente são efectuados testes de rastreio. Na sífilis latente precoce os testes não treponémicos são reactivos, mas com o decorrer do tempo o doente entra na fase de latência tardia e a probabilidade dos testes não treponémicos apresentarem reactividade diminui.

Numa população com baixa prevalência de infecção (1 a 2%), a especificidade

dos testes não treponémicos e dos testes treponémicos é de cerca de 99%, pelo que há um aumento da possibilidade de se obterem resultados de falsa reactividade. Contudo, as causas desse tipo de reacções para os testes não treponémicos são diferentes das dos testes treponémicos, pelo que a reactividade de um teste de um grupo pode ser confirmada pela execução de um teste do outro grupo (Larsen e Johnson 1998).

O diagnóstico definitivo de sífilis latente não é, em regra, confirmado, visto ser difícil a obtenção de uma amostra para detecção directa de *T. pallidum*. O diagnóstico presuntivo deve basear-se na reactividade de um teste treponémico associada à reactividade de um teste não treponémico, sem história de sífilis tratada ou no caso de ter existido sífilis tratada no aumento, em duas diluições, no título de um teste não treponémico. Os doentes com co-infecção por VIH podem apresentar títulos de testes não treponémicos mais elevados no estágio de sífilis latente recente, tal como pode suceder nos outros estádios da sífilis recente (Rofls *et al.* 1997, Musher 1991, Gourevitch *et al.* 1993, Jurado *et al.* 1993), excepção feita quando o doente apresenta imunodeficiência muito avançada (Gregory *et al.* 1990 e Hicks *et al.* 1987). De qualquer modo, quando se suspeita de sífilis utilizam-se os critérios anteriormente referidos.

Sífilis tardia

A sífilis latente tardia ocorre em cerca de um terço dos doentes que não são tratados ou em que a terapêutica não foi eficaz, enquanto que os sintomas de sífilis tardia podem ocorrer 10 a 20 anos após a infecção inicial. No que se refere aos testes serológicos, 30% dos doentes com sífilis tardia apresentarão reactividade no teste treponémico sendo o teste não treponémico não reactivo, pelo que devem ser executados testes treponémicos em todos os doentes com teste não treponémico não reactivo e suspeita de sífilis tardia.

O diagnóstico definitivo de gomas (sífilis tardia benigna) pode basear-se na observação do microrganismo por uma técnica microscópica ou por técnica de PCR (Horowitz *et al.* 1994), sendo de referir que o número de treponemas pode ser pequeno. O diagnóstico presuntivo pode ser fundamentado por testes treponémicos reactivos e história de sífilis não tratada.

O diagnóstico de sífilis cardiovascular é afirmado com base na presença de insuficiência ou de aneurisma aórtico, teste treponémico reactivo e história de sífilis não tratada.

O exame do liquor com teste VDRL e exame citológico e químico do mesmo está recomendado nos doentes com sífilis latente tardia e nos com sintomas e/ou sinais de neurosífilis.

A neurosífilis tem sido subdividida em neurosífilis assintomática, neurosífilis meningovascular e neurosífilis parenquimatosa. A neurosífilis assintomática é definida por ausência de sinais ou sintomas neurológicos associados à presença de teste serológico para sífilis reactivo no soro e alterações no exame citoquímico do liquor e/ou reactividade deste aos testes serológicos. Relativamente ao exame citoquímico do liquor e à serologia podem-se observar pleiocitose ($> 5/\text{cm}^3$), e aumento de proteínas ($> 45 \text{ mg/dl}$), assim como VDRL reactivo ou a evidência de produção local de anticorpos (Tratmont 1995a). A pesquisa de ADN de *T. pallidum* por PCR ou isolamento deste microrganismo (inoculação em animal) são também evidência de neurosífilis assintomática (Tratmont 1995a).

Sempre que um teste VDRL for reactivo no liquor, deve ser efectuada quantificação do mesmo, para efeitos de monitorização do resultado da terapêutica. Resultados de VDRL falsamente reactivos no liquor são muito raramente observados (Horowitz *et al.* 1994), enquanto que reacções falsamente negativas podem ocorrer em doentes com neurosífilis sintomática e assintomática, pelo que um teste de VDRL não reactivo, não exclui o diagnóstico. Os testes específicos como o FTA-Abs e o TPHA também têm sido utilizados, sendo mais sensíveis, mas a sua reactividade pode resultar da difusão de imunoglobulinas para o liquor ou da contaminação deste por pequenas quantidades de sangue (Swartz 1999). A produção de anticorpos a nível do sistema nervoso central de forma a discriminar a invasão do mesmo, poderá ser medida directamente pela pesquisa de anticorpos de tipo IgM (Luger *et al.* 1981, Lee *et al.* 1986) ou pelas seguintes fórmulas: (1) título do TPHA-IgG no LCR / IgG total /mg no LCR a dividir pelo título de TPHA-IgG no soro/imunoglobulina total/mg no soro = Índice de TPHA-IgG, (2) título de TPHA no LCR a dividir pela concentração da albumina do LCR/(mg/dl) $\times 10^3$ /

concentração da albumina no soro (mg/dl) = Index de TPHA. A razão albumina no soro/albumina no LCR superior a 144 é indicativa de barreira hematoencefálica intacta, enquanto que um index TPHA-IgG superior ou igual a três e um index de TPHA superior ou igual a 100 são indicativos de produção local de síntese de anticorpos específicos.

Embora o teste de FTA-Abs não seja considerado como teste padrão nesta situação, ele tem sido utilizado para excluir o diagnóstico de neurosífilis quando se apresenta não reactivo no liquor (Jaffe *et al.* 1978b, Marra *et al.* 1995). No entanto, um FTA-Abs reactivo no liquor, por si só, pode não ser indicativo de neurosífilis já que, por exemplo, pode apenas indicar a presença de anticorpos de um caso de sífilis correctamente tratada (Jaffe *et al.* 1978b, Marra *et al.* 1995).

Avaliação após a terapêutica

Para avaliar a eficácia da terapêutica os doentes devem ser monitorizados no que se refere à resolução dos sintomas e sinais e, ainda, à diminuição do título de anticorpos anticardiolipina, visto serem estes os que diminuem com aquela. A diminuição no título de anticorpos correspondente ao factor quatro (ou seja duas diluições), após a terapêutica presume cura, enquanto que o aumento estabelece insucesso terapêutico ou corresponde a re-infecção (Fiumara 1978, 1979, 1980a, 1980b). O teste não treponémico deve ser efectuado no soro do doente e sempre que possível deve utilizar-se o mesmo tipo de teste e o mesmo laboratório.

Apesar de não existir um critério de cura ou de insucesso terapêutico, a persistência de sinais e de sintomas ou um sustentado aumento em duas diluições indicam terapêutica ineficaz. As normas do CDC (2002a) sugerem, também, que a não redução em duas diluições após seis meses de terapêutica em doentes com sífilis recente e sífilis secundária identifica falência na terapêutica, assim como a ausência na diminuição em duas diluições após 12 a 24 meses em doente com sífilis latente e títulos iniciais superiores ou iguais a 1:32. O tempo necessário para que haja redução em duas diluições após a terapêutica parece ser maior para o RPR que para o VDRL (Brown *et al.* 1985).

Na maioria dos doentes com sífilis recente há grande diminuição dos títulos podendo mesmo ser indetectáveis após três anos da terapêutica (Fiumara 1978, 1980a, Brown *et al.* 1985, Romanowski *et al.* 1991). Títulos baixos podem persistir em aproximadamente 50% desses doentes, dois anos após tratamento. Essa persistência de seropositividade não significa falência na terapêutica, mas sim que esses doentes se mantêm “serofastidiosos” (teste persistentemente reactivo), mesmo quando é instituído novo tratamento (Fiumara 1979).

7. Terapêutica

Desde a introdução da sífilis na Europa, foram recomendados diversos métodos e fármacos para a terapêutica desta infecção.

O mercúrio e seus derivados foram os primeiros compostos a ser utilizados sob a forma de fumigações (Sartin e Perry 1995) ou através das vias cutânea, oral, rectal ou injectável (Rodrigues e Silva 1987). O mercúrio induzia alguma melhoria nos sintomas, levando a uma sintomatologia menos severa, embora não curasse a doença. No entanto, este agente provocava reacções tóxicas graves, sendo de realçar o aparecimento de intenso aumento de salivação, estomatites, erupções cutâneas, perturbações gastrintestinais e lesões do fígado e rim. William Wallace (1791-1838) introduziu a terapêutica com iodeto associado a pequenas doses de mercúrio, a fim de diminuir essas reacções tóxicas. Em 1884 foram feitas algumas tentativas de substituir mercúrio por bismuto, mas foi apenas em 1912 que o Na-K-bitartrate foi introduzido no tratamento, por Sazerac e Levaditi. Em seguida, foram tentados outros metais como tellurium, vanadium, platinum e ouro que se mostraram ineficazes.

A era da quimioterapia moderna inicia-se com Paul Ehrlich (1854-1915) e seu associado Sahachiro Hata (1873-1938) que desenvolveram um derivado arsenical, o diaxidiamidoarsenobenzol (Salvarsan) que actuava directamente no microrganismo e cuja eficácia rapidamente se demonstrou ser superior à do mercúrio, tornando-se, então o medicamento de eleição para a terapêutica antilúética (Sartin e Perry 1995). Embora inicialmente Ehrlich propusesse uma injeção única de 0,3 a 0,4 g, esta foi ineficaz, o que levou não só ao aumento

das doses, como do número de injeções que passaram a ser repetidas, em regra de cinco a oito, seguidas de novo ciclo após pausa de três a quatro semanas, se a reacção de Wasserman se mantivesse positiva (Rodrigues e Silva 1987). No entanto, o Salvarsan era ineficaz na paralisia cerebral, pelo que em 1917 Wagner von Jauregg (1857-1940), psiquiatra em Viena, introduziu a técnica de inoculação da malarioterapia para o tratamento dos casos de paralisia, confirmando experiências passadas que pareciam demonstrar que temperaturas elevadas tinham efeito curativo no processo crónico. Mais tarde, os americanos Fred Kislig e Walter Simpson inventaram um aparelho para produzir electropirécia. Este aparelho induzia quatro a oito horas de febre por dia, permitindo diminuição na dose de salvarsan a utilizar. No entanto, esta metodologia não trouxe grandes benefícios aos doentes com infecção por *T. pallidum*.

Atendendo a que o principal objectivo da terapêutica de qualquer infecção é a prevenção da transmissão e das complicações tardias que afectam o doente, a verdadeira revolução na terapêutica da sífilis ocorreu em 1943, quando Mahoney *et al.* (1943) utilizaram a penicilina, com sucesso, em quatro doentes com sífilis recente que recuperaram por completo. Na realidade, nenhuma doença foi tão dramaticamente afectada pela descoberta da penicilina como o foi a sífilis. A incidência diminuiu dezoito vezes, de um pico de setenta e dois casos por cem mil habitantes em 1943 para quatro em 1956 (Tramont 1987).

Os regimes iniciais da terapêutica consistiam em injeções intramusculares de penicilina de curta duração (penicilina G) durante oito a 10 dias, as quais, por serem dolorosas, dificultavam muito a adesão do doente à terapêutica (Tramont 1987). Uma das primeiras penicilinas injectáveis de acção prolongada a ser utilizada foi a penicilina procaínica em óleo com monoesterato de alumínio. A eficácia da penicilina para o tratamento da infecção a *T. pallidum* foi comprovada através da sua utilização na prática clínica, antes mesmo que estudos controlo terapêutico tivessem sido efectuados.

Embora tenham sido publicados diversos guias de terapêutica (CDC 1991a, CDC 1998, 2002a; Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases 1999a, 1999b, WHO 2001), não existem estudos prospectivos que permitam estabelecer a dose óptima ou a

duração da terapêutica para os diferentes estádios da infecção.

A penicilina oral não é utilizada por não atingir níveis adequados no sangue. Para a terapêutica eficaz, o agente antimicrobiano deve atingir nível treponemicida no sangue e no liquor em caso de neurosífilis. Os níveis de penicilina superiores a 0.018 mg/l são considerados treponemicidas (Idsoe *et al.* 1972), embora esse valor esteja longe da sua eficácia máxima “in vitro”, o qual é de 0,36 mg/l (Eagle *et al.* 1950).

A penicilina benzatínica apresenta um pico de concentração plasmática entre as 13 e as 24 horas, com concentração eficaz mantida durante sete a 10 dias. Por outro lado, a penicilina procaínica apresenta um pico de concentração plasmática máximo entre uma a quatro horas, com concentração eficaz mantida entre as 12 e as 24 horas. Para ser eficaz, a concentração treponemicida deve ser mantida, pelo menos, durante sete dias para cobrir o tempo de divisão dos treponemas (30 a 33 horas) na sífilis recente, mas uma duração mais prolongada de tratamento é necessário na sífilis tardia, situação na qual a divisão do microrganismo é mais lenta. Os treponemas podem persistir mesmo após terapêutica aparentemente com sucesso, o que pode resultar do facto de existirem bactérias que “escaparam” à terapêutica ou que ainda se dividem mais lentamente (Collart *et al.* 1964, Yobs *et al.* 1968, Smith *et al.* 1968, Hardy *et al.* 1970, Tramont 1976).

Como referido, a penicilina e os seus derivados são os agentes antimicrobianos indicados para a terapêutica da sífilis, desde que utilizados nas doses recomendadas. Em doentes com sífilis recente, secundária e latente recente e imunologicamente competentes é recomendada a utilização de uma dose única de 2,4 milhões de UI de penicilina G benzatínica (Larsen *et al.* 1998), a qual resulta em concentrações bactericidas que se mantêm pelo menos, durante três semanas (McCracken *et al.* 1973, Rein 1976). Nas situações de neurosífilis deve ser utilizada penicilina G cristalina aquosa ou penicilina procaínica, porque a penicilina benzatínica parece não atingir níveis treponemicidas no sistema nervoso central (Mohr *et al.* 1976, van der Valk *et al.* 1988). Foram identificados *T. pallidum* viáveis no liquor após este tipo de terapêutica (Lukehart *et al.* 1988) e relatados casos de insucesso, especialmente da neurosífilis e de sífilis ocular (Johns *et al.* 1987, Musher *et al.* 1990).

Terapêutica da sífilis recente

Recomenda-se dose única de 2,4 milhões de unidades de penicilina benzatínica para cura clínica em situações de sífilis primária e sífilis secundária, o que previne a transmissão sexual e as complicações tardias. Deve notar-se que em todos os doente com sífilis deve ser efectuado rastreio de infecção concomitante por VIH. Em áreas de alta prevalência desta infecção ou com comportamentos de risco para a mesma, deve repetir-se a pesquisa de anticorpos anti-VIH três meses depois, se o primeiro teste for negativo. Aos doentes com sífilis e com sintomas sugestivos de doença neurológica ou oftálmica deve ser efectuado exame do liquor e exame oftalmológico, sendo a terapêutica estabelecida de acordo com o resultado desses exames. A invasão do sistema nervoso central por *T. pallidum* associada a alterações do exame citoquímico do liquor é comum no adulto com sífilis primária ou sífilis secundária. No entanto, a neurosífilis apenas se desenvolve num pequeno número de doentes (aos quais deve ser prescrito o regime terapêutico recomendado), pelo que a menos que estejam presentes sintomas ou sinais neurológicos ou oftálmicos, a análise do liquor não é recomendada na sífilis recente.

Os doentes com sífilis recente devem ser monitorizados clínica e serologicamente, seis e 12 meses após a terapêutica. Quando não se observa diminuição em duas diluições no título inicial de um teste não treponémico, seis meses após a terapêutica da sífilis primária ou sífilis secundária, provavelmente aquela não foi adequada.

A persistência ou recorrência de sintomas ou sinais e/ou título de teste não treponémico persistentemente aumentado em duas diluições (comparativamente ao título considerado como de base na altura do tratamento) coloca a hipótese de re-infecção ou de terapêutica ineficaz. Estes doentes devem ser tratados de novo e reavaliados para co-infecção pelo VIH. Como é difícil o diagnóstico diferencial entre re-infecção a *T. pallidum* e insucesso terapêutico, deverá recorrer-se a novo exame citoquímico e teste não treponémico do liquor, a fim de se excluir prováveis alterações a nível do sistema nervoso central (CDC 2002a).

Sífilis latente

No que se refere à terapêutica de sífilis latente, há que recordar que esta é caracterizada por seroreactividade sem qualquer outro sinal ou sintoma de doença e que se subdivide em sífilis latente recente e sífilis latente tardia. A recomendação terapêutica difere nestas duas situações, isto é, uma dose única de 2,4 milhões de UI de penicilina G benzatínica na sífilis latente recente e 2,4 milhões UI de penicilina G benzatínica, por semana, durante três semanas consecutivas na sífilis latente tardia.

O diagnóstico de sífilis latente recente faz-se quando no decurso de um ano (CDC 2002a) ou dois anos precedentes (WHO 2001), o doente apresentou seroconversão, sinais ou sintomas de sífilis primária, secundária, ou teve um parceiro sexual com diagnóstico de sífilis primária, secundária ou recente.

Os doentes com sífilis latente de duração indeterminada são considerados para efeito de terapêutica como tendo sífilis latente tardia (CDC 2002a). Todos os doentes com sífilis latente devem ser avaliados através da pesquisa de sinais e de sintomas de infecção primária ou secundária, assim como para evidência de sífilis terciária (aortite, goma, irite etc.), com avaliação concomitante para infecção por VIH.

A monitorização dos doentes com sífilis latente processa-se através do resultado obtido com um teste não treponémico quantitativo aos seis, 12 e 24 meses após a terapêutica. Geralmente, o título diminui mais rapidamente em doentes em estádios mais precoces, com títulos menores e naqueles sem infecção sífilítica prévia (Fiumara 1980b, Brown *et al.* 1985, Romanowski *et al.* 1991).

Sífilis terciária

A sífilis terciária refere-se à sífilis cardiovascular e às gomas com exclusão da neurosífilis, devendo instituir-se penicilina G benzatínica 2,4 milhões de UI intramuscular, semanalmente, durante três semanas consecutivas. A estes doentes e antes da terapêutica, deve ser efectuada punção lombar para estudo do liquor a fim de se excluir o diagnóstico de neurosífilis. Os doentes com sífilis cardiovascular devem também ser acompanhados por um cardiologista,

porque mesmo com terapêutica adequada a doença cardíaca pode progredir.

Neurosífilis

Em qualquer estágio da infecção a *T. pallidum* pode ocorrer invasão do sistema nervoso central, pelo que qualquer evidência clínica de envolvimento neurológico (disfunção cognitiva, deficit sensorial ou motor), sintomas oftálmicos ou otológicos, alteração a nível de nervos cranianos e sintomas ou sinais de meningite, obriga a punção lombar para exame do liquor, e identificação dos que apresentam alterações, as quais devem ser monitorizados após a terapêutica. A terapêutica indicada para a neurosífilis do adulto é a penicilina G aquosa procaínica, 18 a 24 milhões de UI por dia, em doses de três a quatro milhões de unidades via endovenosa de quatro em quatro horas, em perfusão contínua, durante 10 a 14 dias.

A uveíte sífilítica ou outras manifestações oculares (neuroretinite, nevrite atrófica) estão frequentemente associadas a este quadro clínico, devendo os doentes ser tratados de acordo com as recomendações para a neurosífilis.

Aos doentes com pleiocitose inicial no liquor este exame deve ser repetido de seis em seis meses após a terapêutica, até que a contagem das células seja normal. As proteínas e o VDRL no liquor deverão ser avaliadas. No entanto, estes parâmetros normalizam mais lentamente do que a contagem de células (Hahn e Clark 1946 citado por Larsen *et al.* 1998). Se a contagem das células no liquor não diminuir seis meses após terapêutica, ou se o liquor não se encontrar com todos os seus parâmetros dentro da normalidade, dois anos após a mesma, o doente deve ser tratado, de novo (CDC 2002a).

Reacção de Jarisch-Herxheim

Esta reacção sistémica ocorre uma a duas horas após o início da terapêutica da sífilis com antibióticos, sobretudo com a penicilina. O quadro clínico é caracterizado pelo aparecimento súbito de arrepios, febre, mialgias, cefaleias, taquicardia, hiperventilação, vasodilatação e hipotensão moderada, tratando-se de uma situação particularmente comum após o tratamento de sífilis

secundária (70-90%), mas que pode ocorrer após a terapêutica de qualquer outro estágio da sífilis (10 a 25%) (Tramont 1990). A reacção mantém-se, pelo menos, durante 12 a 24 horas e tem sido relacionada com a libertação de produtos pirogênicos estáveis ao calor pelos treponemas (Young *et al.* 1982). Trata-se de uma síndrome autolimitada, melhorando com terapêutica sintomática com ácido acetilsalicílico de quatro em quatro horas, durante 24 a 48 horas. Os corticóides diminuem, também, o efeito da reacção e podem ser utilizados como terapêutica adjuvante, sobretudo quando se trata de neurosífilis ou sífilis cardiovascular, já que nestes casos o aparecimento da reacção de Jarisch-Herxheim pode ter consequências particularmente graves.

Terapêutica em doentes alérgicos à penicilina

A terapêutica dos indivíduos com sífilis e com alergia à penicilina envolve a utilização de outros antibióticos e requer administrações múltiplas, ficando a eficácia dependente da adesão do doente à terapêutica. Em situações de sífilis primária e sífilis secundária a doxiciclina (100 mg, por via oral, duas vezes por dia, durante 14 dias) e a tetraciclina (500 mg, por via oral, quatro vezes por dia, durante 14 dias) são as alternativas que têm sido utilizadas com mais sucesso (Rein 1972), sendo que a adesão é provavelmente melhor com a doxiciclina, por a tetraciclina apresentar, com mais frequência, efeitos colaterais gastrintestinais. A eritromicina também tem sido utilizada, mas apresenta taxas de insucesso superiores às da penicilina G benzatínica, não previne a sífilis congénita (Hashisaki *et al.* 1983) e não penetra no liquor nem atravessa a barreira placentária (Philipson *et al.* 1973).

Alguns estudos clínicos utilizando cefalosporinas de primeira geração (Nicolis e Loucopoulos 1974, Duncan e Knox 1974) e amoxicilina (Onoda 1979) sugerem que estes antibióticos poderão ser eficazes no tratamento de sífilis recente, mas há poucas informações sob a sua utilização por rotina. Os estudos com ceftriaxona (Steele 1984, Hook *et al.* 1988), o qual apresenta boa penetração na barreira hemato-encefálica, têm mostrado resultados eficazes.

Alguns estudos com azitromicina (Lukehart *et al.* 1990) demonstraram a sua eficácia no tratamento da infecção experimental em modelo animal (coelho),

num pequeno número de doentes com sífilis recente (Verdon *et al.* 1994) e na prevenção da sífilis em doentes expostos, numa dose única de 1g por dia, por via oral (Hook *et al.* 1999). No entanto, serão necessários mais estudos, visto a eficácia destas terapêuticas alternativas não estarem perfeitamente documentadas.

Os doentes com alergia à penicilina e cuja aderência ou monitorização pós-terapêutica não pode ser assegurada devem ser dessensibilizados e tratados com penicilina (CDC 2002a).

No tratamento de doentes com sífilis latente tardia ou de duração indeterminada as únicas terapêuticas alternativas aceitáveis são a doxiciclina ou a tetraciclina, durante 28 dias, devendo o doente ser cuidadosamente vigiado do ponto de vista clínico e serológico. Como regimes alternativos na neurosífilis e em indivíduos com função imune normal, foram utilizados outros regimes terapêuticos como a amoxicilina na dose de 2g associada a 500 mg de probenecid, quatro vezes ao dia durante 14 dias (Faber *et al.* 1983, Morrison *et al.* 1985, Fiumara 1989, Hay *et al.* 1990a), ou doxiciclina na dose de 200 mg por via oral, duas vezes por dia, durante três semanas (Yim *et al.* 1985). A ceftriaxona tem sido, também, utilizada como alternativa em doentes com neurosífilis, embora possa existir certa reacção cruzada com a penicilina, numa dose de 2 g por dia intramuscular ou intravenosa durante 10 a 14 dias (Marra *et al.* 1992, Hook *et al.* 1986).

8. Prevenção e controlo

Já em 1937 o cirurgião Thomas Parran, citado em Singh e Romanowski (1999), definiu cinco pontos importantes: informação e educação pública, rastreio, tratamento, notificação dos parceiros e terapêutica profilática para prevenção e controlo da infecção.

A educação do público em geral sobre as consequências e o modo de prevenir a sífilis e outras IST é essencial.

O rastreio para a sífilis deve ser efectuado por diversas razões, incluindo a prevenção das complicações, a prevenção da sífilis congénita e a diminuição da

sua transmissão (Schmid 1996). Para a prevenção da sífilis congénita o CDC recomenda que todas as grávidas, no 1º e 3º trimestre de gravidez devem efectuar rastreio laboratorial para sífilis (CDC 1998).

Por razões óbvias o rastreio deve também ser efectuado entre os dadores de sangue.

O diagnóstico e tratamento da infecção são componentes essenciais no controlo da mesma (Cates *et al.* 1996) uma vez que a detecção precoce e a terapêutica consequente diminuem as complicações, assim como a transmissão (CDC 1988, Hart 1980).

Historicamente, a notificação dos contactos com avaliação, tratamento e monitorização são essenciais para limitar a disseminação da doença (Kaufman *et al.* 1974). Uma vez que não é possível prever quais os contactos de doentes com sífilis que se irão infectar, tem sido recomendado o tratamento profiláctico (Hart 1980, Willcox 1973). Este tipo de procedimento associado à notificação dos parceiros tem-se mostrado eficaz no controlo de epidemias (Ball 1965, Lee *et al.* 1987).

A investigação é, também, essencial para identificar e avaliar novos métodos de controlo da sífilis e da sua prevenção. Por exemplo, uma dose única oral de medicação associada a um teste rápido não invasivo seria extremamente útil na identificação e no controlo dos doentes (St. Louis 1996). A sequenciação recente do genoma de *T. pallidum* tem levado ao desenvolvimento de técnicas de diferenciação de estirpes e subtipos, o que irá permitir melhorar os estudos epidemiológicos da sífilis (St. Louis e Wasserheit 1998). Para a eliminação eficaz da infecção será de grande importância identificar como, porquê e onde a transmissão de sífilis persiste nos períodos de declínio.

9. Objectivos gerais

Tendo em conta as dificuldades existentes no que se refere ao diagnóstico de infecção a *Treponema pallidum* são objectivos gerais desta tese:

- avaliar várias técnicas serológicas para o diagnóstico de sífilis, no sangue e no liquor, incluindo técnicas comercializadas, não comercializadas e técnicas de biologia molecular.
- estudar a associação entre falsa reactividade dos testes não treponémicos em indivíduos VIH e em toxicodependentes.
- desenvolver e optimizar uma técnica de subtipagem de *Treponema pallidum* que possa ser utilizada em estudos de epidemiologia molecular e de patogénese deste microrganismo.

Capítulo 2. Pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* no sangue

1. Introdução

Como referido no capítulo 1, o diagnóstico da sífilis baseia-se na avaliação clínica, na detecção e identificação do seu agente etiológico e na utilização de testes serológicos para pesquisa de anticorpos.

A variabilidade das lesões dermatológicas sífilíticas e das outras apresentações clínicas desta infecção, com os seus estádios sintomático e assintomático, e as suas manifestações atípicas, torna essencial a detecção do microrganismo ou a pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum*. A sífilis primária, a neurosífilis, a sífilis latente (sobretudo a latente tardia ou a de duração indeterminada) e a sífilis congénita assintomática são as que mais problemas colocam do ponto de vista de diagnóstico. Estes tornam-se, ainda, mais complexos, quando o doente apresenta infecção simultânea por VIH ou nos indivíduos toxicodependentes por via endovenosa, nos quais a reactividade dos testes serológicos pode estar alterada.

Os diversos testes serológicos usados no diagnóstico laboratorial são agrupados e classificados consoante a sua aplicação em testes de rastreio, testes de confirmação e testes de monitorização terapêutica. Esta forma de agrupamento dos testes serológicos para o diagnóstico da sífilis deve-se às diferenças existentes entre o desenho de cada teste e a sua especificidade e sensibilidade, ao início e duração da sua reactividade, à sua manutenção ou desaparecimento após a terapêutica e à associação entre a reactividade e os diferentes estádios da infecção.

A importância e a dificuldade do diagnóstico serológico da sífilis é bem reconhecida, como demonstrado pela publicação de recomendações a utilizar no seu diagnóstico (Young 1992a, 2000, CDC 1993, 1998 e 2002a, Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases 1999a, 1999b, Egglestone e Turner 2000). Tradicionalmente, efectua-se primeiro o rastreio com um teste de floculação, utilizando um antigénio não treponémico para a detecção de anticorpos anticardioplipina, como o Venereal Disease Research Laboratory Test (VDRL) ou o Rapid Plasma Reagin Test (RPR).

Se um destes é reactivo, deve confirmar-se com um teste que utilize antígenos treponémicos para identificação específica de anticorpos anti-*T. pallidum*, como o teste de hemaglutinação (TPHA) ou o teste de imunofluorescência indirecta (FTA-Abs). Apesar de, em geral, ser preconizada a associação de um teste específico e um teste inespecífico no rastreio dos doentes, actualmente existem, recomendações, de alguns grupos de investigadores que sugerem que, em populações com baixa prevalência de infecção a *T. pallidum* a utilização de uma técnica imunoenzimática (EIA) com base num antígeno treponémico, pode ser a alternativa apropriada ao rastreio combinado de um teste não treponémico com um teste treponémico (Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases 1999a, 1999b, Egglesstone e Turner 2000). Contudo, em regiões onde a prevalência é alta, continua a ser recomendada a utilização de um teste não treponémico com confirmação de reactividade por um teste treponémico (CDC 2002a).

Os objectivos deste capítulo foram:

- Comparar entre si os testes serológicos clássicos utilizados no diagnóstico da sífilis (treponémicos e não treponémicos), com a finalidade de relacionar a sua reactividade com a presença de infecção a *T. pallidum*.
- Estudar a associação entre a falsa reactividade dos testes não treponémicos quando presente infecção por VIH e/ou a toxicodependência.
- Avaliar duas novas técnicas comercializadas, uma de aglutinação (TP.PA) e uma imunoenzimática (SYPHILIS-EIA), assim como uma técnica não comercializada de Western blot, no diagnóstico da infecção a *T. pallidum* nos seus diferentes estádios.

2. Material e métodos

2.1. População

Os doentes incluídos no estudo foram provenientes de consultas e serviços hospitalares descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Origem da população estudada

Origem	Número de casos	%
Centro Saúde da Lapa	912	69,5
Hospital de Egas Moniz	118	9,0
Hospital Garcia de Orta	62	4,7
Hospital S. Francisco de Xavier	36	2,7
Hospital S. João de Deus	19	1,4
Maternidade Dr. Alfredo da Costa	70	5,3
Instituto de Higiene e Medicina Tropical	59	4,5
Outros	36	2,7
Total	1312	100,0

Após consentimento informado, foram obtidos dados epidemiológicos e clínicos, efectuada colheita de sangue e de liquor, quando se pretendia excluir diagnóstico de neurosífilis.

O sangue foi centrifugado à chegada ao laboratório para obtenção de soro. Este foi dividido em aliquotas de 0,5ml, sempre que possível, sendo uma parte utilizado de imediato para a execução dos testes serológicos e o restante armazenado a - 20°C para posterior utilização, quando necessário.

Receberam-se amostras de um total de 1312 indivíduos com idade média de 39 anos, variando entre os 11 e os 83 anos, com predomínio dos grupos etários entre os 20 e os 55 anos (Figura 8).

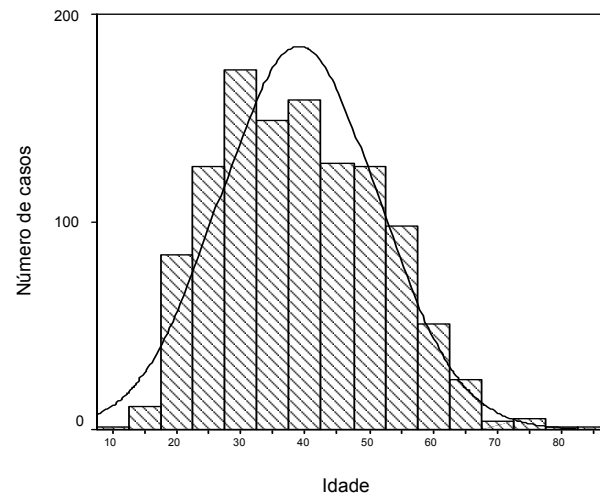


Figura 8. Distribuição etária da população

No que se refere à sua distribuição por gênero, estudaram-se 464/1312 (35,4%) mulheres, com idade média de 35,21 das 403 com idade conhecida, e 848/1312 (64,6%) homens com idade média 41,19 entre os 740 com idades conhecidas (Figura 9).

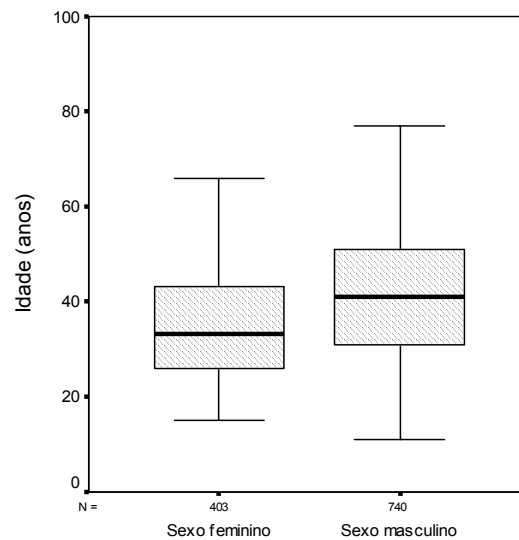


Figura 9. Média de idades por sexo da população estudada

Aos 1312 indivíduos incluídos no estudo, foi diagnosticada: sífilis primária em 62, sífilis secundária em 45, sífilis latente em 336 e neurosífilis em 8. Dos restantes 861 indivíduos, 418 não apresentavam história clínica, sintomas ou sinais compatíveis com diagnóstico de sífilis nem reactividade serológica, sendo considerados como não possuindo infecção a *T. pallidum*, enquanto que 443, por terem efectuado terapêutica para a sífilis e não apresentarem sintomas ou sinais daquela infecção, foram considerados como sífilis tratada (Tabela 11).

Tabela 11. Grupos populacionais estudados

	Nº de casos	Casos/total (%)	Válidos (%)	Cum. (%)
Sem sífilis	418	31,9	31,9	31,9
Sífilis recente	62	4,7	4,7	36,6
Sífilis secundária	45	3,4	3,4	40,0
Sífilis latente	336	25,6	25,6	65,6
Neurosífilis	8	0,6	0,6	66,2
Sífilis tratada	443	33,8	33,8	100,0
Total	1312	100,0	100,0	

Aos indivíduos com sífilis era pedido que voltassem à consulta, para monitorização após a terapêutica, aos três, seis, 12 e 24 meses, dependendo do estágio da sífilis e de acordo com as recomendações do CDC (2002a), na qual se efectuava uma observação clínica e colheita de sangue.

Para o estudo da associação entre a falsa reactividade nos testes não treponémicos e infecção por VIH e/ou a toxicodependência incluíram-se soros de doentes infectados por VIH provenientes da Unidade Virologia do IHMT e soros provenientes de uma população de mulheres reclusas do Estabelecimento Prisional de Tires, colhidos no âmbito de um projecto da Unidade de DST subsidiado pela Comissão Nacional de Luta contra a SIDA.

2.2. Teste VDRL – Disease Research Laboratory

A técnica utilizada foi o VDRL *Omega Diagnostic Limited* – IMMUNOTREP, um teste de floculação de leitura microscópica que utiliza como antigénio uma solução etanólica de 0,9% de colesterol, 0,3% de cardiolipina bovina e 0,2% de lecitina. A pesquisa de anticorpos foi efectuada em lâmina, segundo protocolo fornecido pela casa comercial.

O antigénio foi preparado antes da execução do teste, sendo a solução antigénica diluída com o tampão VDRL salino fornecido.

As amostras de soros foram descomplementados por aquecimento a 56°C durante 30 minutos antes do teste ser efectuado e sempre que existiu um intervalo de mais de quatro horas entre a inactivação e a sua execução.

Todas as amostras foram testadas não diluídas (50 µl de amostra adicionada de 20 µl de antigénio) a que se seguia uma diluição de 1:16 para os soros, a fim de prevenir o fenómeno de prozona. Um soro reactivo e um soro não reactivo foram sempre testados em simultâneo com as amostras, de modo a servirem de controlo. A leitura do resultado foi efectuada ao microscópio óptico usando ocular e objectiva de 10x, e os resultados registados como teste positivo sempre que se observaram agregados, fracamente positivo quando presentes agregados finamente dispersos e negativo quando não existiam agregados.

Todas as amostras reactivas foram em seguida semiquantificadas, efectuando-se diluições seriadas de factor dois da amostra a estudar com o tampão VDRL fornecido e considerando-se como título (em dils - D) o valor recíproco da última diluição na qual se observou a reactividade.

2.3. Teste RPR – Rapid Plasma Reagin

O teste RPR, *Rapid Plasma Reagin (RPR)* – BECTON DICKINS é de leitura macroscópica, constituído por uma suspensão antigénica estabilizada de partículas de carbono pronta a utilizar, constituída por 0,003% de cardiolipina, 0,0020 – 0,022% de lecitina, 0,09% de colesterol, 0,02% de carbono, 0,0125 M de ácido etilenediaminotetracético (EDTA) e 10% de cloreto de colina. O EDTA

estabiliza o antígeno, eliminando a necessidade de preparação diária, obrigatória quando se utiliza o teste VDRL; o cloreto de colina torna desnecessária a inactivação dos soros e aumenta a reactividade do antígeno, enquanto que as partículas de carbono permitem a visualização macroscópica da reacção.

O teste foi efectuado em cartões fornecidos e executado conforme o protocolo estabelecido. Para se efectuar o seu controlo, a suspensão antigénica era testada com soros controlo de vários níveis de reactividade antes de se testar as amostras.

Tal como para o VDRL, as amostras foram testadas não diluídas (50 µl de amostra e 17 µl de suspensão antigénica), sendo o soro também diluído a 1:16 em soro fisiológico para controlar o fenómeno de prozona.

A leitura foi efectuada após rotação de oito minutos em agitador mecânico a 100 rpm, considerando-se haver reactividade quando se observou aglutinação (floculação) forte a mínima. A ausência de aglutinação foi interpretada como falta de reactividade.

Em seguida, quantificaram-se as amostras reactivas. O teste quantitativo foi executado do mesmo modo que o qualitativo, com o pormenor de se terem efectuado diluições seriadas de dois em dois. A diluição realizou-se com soro fisiológico a 0,9%, ou que continha 2% de soro humano seronegativo para infecção por *T. pallidum*, quando de diluição superior ou igual a 1:32. Tal como para o VDRL considerou-se como título a última diluição em que existiu reactividade.

2.4. Teste de imunofluorescência indirecta

O *Fluorescent Treponema Antibody Absorbed Test* – FTA-Abs IgG e FTA-Abs IgM – EUROIMMUN, foi um, dos testes treponémicos utilizados.

Na execução deste, a amostra a estudar é colocada em contacto com o antígeno de *T. pallidum* fixado na lâmina fornecida. A reacção é evidenciada pela utilização de uma imunoglobulina anti-humana anti-IgG ou anti-IgM,

consoante o tipo de anticorpos que se pretendem pesquisar, conjugada com o isotiocianato de fluoresceína, que ao combinar-se com os anticorpos IgG ou IgM que aderiram aos treponemas fixados, resulta numa reacção observável ao microscópio de fluorescência.

As instruções da casa comercial foram seguidas, na execução da técnica. Antes das amostras serem colocadas em contacto com os treponemas fixados nas lâminas, foram absorvidas com *Treponema phagedaenis*, a fim de eliminar reactividade cruzada com anticorpos inespecíficos.

Quando da pesquisa de anticorpos de tipo IgM efectuou-se também imunoabsorção com o reagente *EUROSOR, RF-Absorbent* – EUROIMMUNE. Este reagente contém anticorpos anti-humanos de cabra, com alta afinidade para os anticorpos de tipo IgG, eventualmente presentes na amostra, os quais precipitam após a reacção ter tido lugar.

O factor reumatóide, quando presente, será absorvido pelo complexo IgG/IgG anti-humano, prevenindo-se a falsa reactividade devida à presença daquele factor.

Em cada determinação foram utilizados um controlo reactivo e um controlo não reactivo. As amostras absorvidas e com diluição final de 1:10 (25 µl) foram colocadas durante 30 minutos em contacto com o antigénio fixado na lâmina. Após esse período, os anticorpos não ligados foram lavados com o tampão fosfato salino pH 7,2 (PBS) adicionado de Tween 20 a 0,2%.

Após a lavagem, adicionou-se o anticorpo conjugado anti-IgG ou anti-IgM, diluído a 1:5 em PBS-Tween 20 (20µl), conforme o tipo de anticorpos a evidenciar, efectuando-se nova incubação durante mais 30 minutos.

Por fim, as lâminas foram lavadas, cobertas com óleo de imersão e lamela e observadas ao microscópio de fluorescência com objectiva de 40x.

Para a leitura do resultado considerou-se como presença de reactividade sempre que se observou fluorescência evidente dos treponemas que cobriam a área de reacção na lâmina.

As amostras com ausência de fluorescência dos treponemas foram consideradas como não reactivas.

2.5. Teste de hemaglutinação (TPHA)

O teste de hemaglutinação *TPHA* – *Phasyl 210* – Diagast executado neste trabalho utiliza eritrócitos de carneiro sensibilizados com extracto de *T. pallidum* – estirpe Nichols. Estes, quando colocados em contacto com a amostra a estudar nas placas de microtitulação, aglutinam na presença de anticorpos anti-*T. pallidum* sedimentando em tapete homogéneo. Quando a amostra não contém anticorpos anti-*T. pallidum* não há reacção e os eritrócitos caem em botão no fundo do micropoço.

Para controlo da reacção utilizaram-se células não sensibilizadas, as quais permitem verificar a presença de reactividade inespecífica. A técnica foi efectuada segundo o protocolo fornecido pela casa comercial. Inicialmente as amostras foram rastreadas e as positivas tituladas. Em cada determinação foram usados um soro controlo positivo e outro negativo.

Para o rastreio utilizaram-se 80 µl de eritrócitos não sensibilizados no poço 1 da microplaca e 80 µl de eritrócitos sensibilizados no poço 2, adicionando em seguida 1 µl de soro (diluição de 1:80) ou 10 µl de liquor (diluição 1:8).

A leitura efectuou-se após homogeneização e incubação durante duas horas à temperatura ambiente.

A reacção foi considerada reactiva sempre que se observou o fundo do micropoço completamente atapetado por um véu uniforme ou um véu associado a um ligeiro botão de eritrócitos e não reactiva, quando se visualizou um anel de eritrócitos no fundo do micropoço ou sedimentação em um único ponto.

As amostras com leitura reactiva foram, em seguida, quantificadas por diluições em progressão geométrica de factor dois, a partir de 1:80 da amostra de soro e de 1:8 de amostra de liquor, com o reagente de eritrócitos sensibilizados, efectuando-se, simultaneamente, titulação do controlo positivo. O título da amostra foi considerado o valor da maior diluição em que se observou reactividade.

2.6. Teste de aglutinação (TP.PA)

O teste de aglutinação *SERODIA-TP.PA* – FUJIREBIO INC. é um teste de princípio básico semelhante ao de hemaglutinação, que em vez de eritrócitos utiliza partículas de gelatina sensibilizadas com a estirpe de Nichols de *T. pallidum*.

A técnica foi efectuada em microplacas, segundo o protocolo fornecido pela casa comercial, dirigido apenas a amostras de soro.

Nesta dissertação utilizou-se a técnica de TP.PA em amostras de soro e liquor, comparando-se os resultados com os dos outros testes de pesquisa de anticorpos. As amostras foram rastreadas e as reactivas tituladas, tendo sido sempre utilizado em simultâneo soros, controlo positivo e negativo.

Para o rastreio as amostras foram diluídas com o reagente de diluição fornecido, tendo-se adicionado em seguida 25 µl de partículas não sensibilizadas à diluição da amostra de 1:40 e 25 µl de partículas sensibilizadas à diluição da amostra de 1:80. De seguida, foram, então, homogeneizadas e incubadas durante duas horas à temperatura ambiente, após o que se procedeu à sua leitura. Nesta, foram consideradas como reactivas as amostras que apresentavam partículas aglutinadas, cobrindo a superfície do micropoço uniformemente ou com um anel grande e bem definido de contorno irregular e aglutinação periférica. Pelo contrário, foi estabelecida como ausência de reactividade quando as partículas se concentravam em forma de botão no centro do micropoço, com o contorno externo bem definido e considerada reacção duvidosa quando as partículas tomaram forma de anel compacto com um contorno externo arredondado e liso.

As amostras reactivas foram, em seguida, tituladas, simultaneamente com o controlo positivo, sendo diluídas seriadamente, a partir da diluição de 1:80 com o reagente de diluição, colocando-se em seguida 25 µl de partículas sensibilizadas em cada uma das diluições. A leitura foi efectuada após duas horas de incubação à temperatura ambiente, considerando-se como título a maior diluição que apresentava reactividade.

A execução das amostras de liquor seguiu-se o protocolo utilizado na técnica de TPHA e já referido anteriormente.

2.7. Teste imunoenzimático (EIA)

A técnica imunoenzimática usada neste trabalho foi a SYPHILIS IgG EIA e IgM KIT EIA DiaSorin, utiliza como antígeno extracto de *T. pallidum* (estirpe de Nichols), que se encontra fixado nos poços de uma microplaca.

Para evidenciar essa ligação utilizou-se imunoglobulina anti-humana de tipo IgG ou IgM, conjugada com uma enzima. Esta, ao reagir com um substrato, evidencia, por reacção colorimétrica, a presença ou ausência de anticorpos na amostra.

Novamente, foram seguidas as instruções da casa comercial na execução da técnica. As amostras diluídas a 1:100, com o diluente, foram colocadas em contacto com antígeno purificado de *T. pallidum* que reveste os micropoços da placa. Após incubação de duas horas, os componentes do soro não ligados foram lavados, com tampão fosfato salino (PBS-Tween 20). Em seguida, adicionou-se 100 µl de anticorpo monoclonal anti-humano marcado com a peroxidase, com a diluição de 1:20, aos micropoços da placa, incubando duas horas, com a finalidade de evidenciar a reacção antígeno-anticorpo.

A enzima ligada foi revelada pela reacção com o substrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB). A utilização de anticorpo monoclonal anti-humano de tipo IgG ou IgM conjugado serviu para diferenciar entre os anticorpos de tipo IgG e de tipo IgM, consoante o tipo de anticorpos a pesquisar.

A leitura da reacção imunoenzimática efectuou-se em espectrofotómetro com filtro de 450 nm.

A técnica foi validada pela introdução, em duplicado, de um controlo negativo e de dois controlos positivos, considerando-se fiável quando a média dos controlos era inferior ou igual a 0.250 de densidade óptica (DO) para controlo negativo, entre 0.300 a 0.500 de DO para o controlo positivo baixo e superior a 0.500 de DO para o controlo positivo alto.

Para cada amostra, os resultados foram determinados pelo índice de actividade, que compara a absorvância da amostra com a absorvância do controlo mais baixo. O resultado foi considerado positivo quando o índice foi superior ou igual a 1.1, negativo quando inferior ou igual a 0.9 e duvidoso ou indeterminado quando entre 0.9 a 1.1

2.8. Técnica de Western blot

Neste estudo empregou-se este método na pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* de tipo IgG e IgM.

Preparação de antígeno de *Treponema pallidum*

O antígeno foi preparado a partir de *T. pallidum* (estirpe Nichols), mantido “in vivo” em coelho branco adulto. A estirpe de Nichols de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* utilizada foi gentilmente cedida pelo Dr. Vittorio Sambri do departamento de Microbiologia do Hospital de St. Orsola da Universidade de Bolonha (Bolonha-Itália) e armazenada em azoto líquido.

Os coelhos adultos foram inoculados intratesticularmente, sob anestesia geral, com 1 ml de uma suspensão, com cerca de 2 milhões de *T. pallidum*/ml. Antes de inoculados, foi-lhes retirado sangue para efectuar os testes de RPR e TPHA com a finalidade de excluir infecção a *Treponema paraluiscliviculi*.

Após a inoculação os coelhos foram mantidos no biotério com alimentação sem antibióticos, sendo observados todos dias para o aparecimento de orquite. Após uma semana colheu-se sangue para detecção da presença de anticorpos pelos testes de RPR e TPHA.

Quando se verificava a presença de orquite e de testes serológicos reactivos sacrificou-se o animal (geralmente entre o 12º e o 14º dia após inoculação) por eutanásia com thiopental (Eutasil). Os testículos foram retirados assépticamente, libertados de todos os tecidos envolventes e macerados.

A extracção de *T. pallidum* foi efectuada em frasco contendo 15 ml de meio de extracção estéril, tampão fosfato salino com pH 7.2 (PBS). O macerado foi lavado repetidamente, em PBS estéril (cerca de três lavagens) e removeram-se os restos celulares por centrifugação a 1,400 x g a 4°C. Os sobrenadantes das diferentes lavagens foram decantados e misturados, sendo em seguida centrifugados a 16.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Os sedimentos contendo *T. pallidum* foram lavados com PBS, sendo os treponemas concentrados cerca de cem vezes em relação ao volume primário da centrifugação.

Em seguida foi efectuada observação em microscópio de fundo escuro, feita

contagem, diluição em PBS estéril de modo a obter uma suspensão de treponemas de 10^9 bactérias/ml sendo congelada em pequenos aliquotes a -80°C .

Electroforese das proteínas antigénicas

A electroforese das proteínas do extracto treponémico foi realizada de acordo com Laemmli *et al.* (1970). As fracções proteicas foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida em SDS (SDS-PAGE) a 12% (12 ml de acrilamida a 30%, 7,5 ml de tris-base HCl 1,5M pH 8.8; 4 ml de sucrose a 50%, 9,87 ml de H_2O pura, 300 μl de SDS - dodecil sulfato de sódio a 10%, 300 μl de uma solução de persulfato de amónia [APS] a 10% e 25 μl de solução de tetrametil-etilenodiamina [Temed – Biorad]) em sistema de gel vertical (Hoefer 400, Amersham Pharmacia Biotech).

O gel de separação foi polimerizado entre as placas de vidro, após o que se adicionou o gel de concentração em SDS a 4% (1,7 ml de acrilamida, 6,8 ml de H_2O pura 1,25 ml de tris base HCl 0,5% pH 6,8, 200 μl de SDS, 100 μl de APS e 10 μl de Temed). Um pente contínuo, com um poço para colocação do marcador de pesos moleculares, foi colocado e deixou-se polimerizar, após o que se retirou o pente e se colocou o gel na tina inferior do aparelho de electroforese. Em seguida aplicou-se a tina superior. Ambas as tinas foram preenchidas com o tampão de tris-glicina – SDS (12g de tris base HCl, 57,2g de glicina, 8g de SDS). Em seguida foi depositado o antigénio previamente diluído a 1:2 com o tampão (SDS a 2%, M-Tris pH 6,8, 10% de glicerol, 1% de mercaptoetanol, 0,5 ml de azul de bromofenol a 1%) e fervido durante cinco minutos em banho-maria.

O marcador de peso molecular Rainbow™ (Amersham), tratado da mesma forma que a amostra, foi, também, depositado e fez-se passar pelo sistema uma corrente eléctrica constante de intensidade de 6 mA, cerca de 18 horas. Todos os ensaios foram realizados com uma suspensão de 10^9 *T. pallidum* /ml.

Após a electroforese efectuou-se a detecção das bandas de proteínas por coloração de uma tira do gel com Azul de Coomassie (Merck). Para tal, o gel era colocado numa solução de coloração (quatro comprimidos de Azul de Coomassie R250 dissolvidos em 250 ml de mistura de metanol/ácido acético/água -

40/10/50; v/v/v) durante uma hora a 37°C, sendo descorado em seguida com uma solução descorante (metanol/ácido acético/água (30/10/60; v/v/v) durante o tempo necessário para a visualização das bandas azuis sob um fundo claro.

Western blot

As proteínas antigénicas separadas foram, em seguida, transferidas para uma membrana hidrofóbica de polivinilidene difluoreto (PVDF- Hybond – P - PVDF membrane – Amersham). Antes de se efectuar a transferência, a membrana e o gel foram imersos em tampão de transferência tris-glicina (3,3g tris – base HCl e 14,4g glicina - Merck) sob agitação durante 30 minutos. Ao fim desse tempo, colocou-se o gel e a membrana de PVDF, numa tina vertical (Trans-Blot - Cell-Biorad) completamente submergidos com o mesmo tampão de transferência e entre dois grandes eléctrodos em painel. A transferência decorreu sob corrente eléctrica de 60 V durante uma hora e quinze minutos, após o que a membrana foi retirada e lavada em PBS-Tween 0,1% (v/v).

Esta transferência foi controlada pela visualização do marcador de pesos moleculares na membrana, e por coloração com “tinta da china” (PBS 100 ml, Tween 20 0,3% e tinta da china 100 µl) de uma tira do blot.

Em seguida separou-se a tira com o marcador de peso molecular, sendo esta e a restante membrana identificadas pela data da execução da transferência e guardando-se a membrana no frio a – 4° C até ser utilizado.

Antes da utilização, a membrana foi cortada em tiras de cerca de 2 mm que se colocaram em cuvetes de incubação. Em seguida cada tira foi mergulhada em metanol (100%), passada por água e bloqueada por imersão numa solução de bloqueio (PBS com 5% de leite desnatado - w/v) durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação, sendo em seguida lavada três vezes com o tampão PBS-Tween 20 a 0,1%.

Um volume apropriado da amostra a estudar, de modo a obter uma diluição de 1:100 para os soros e de 1:50 para os líquidos, foi adicionado a cada cuvette de incubação contendo a tira, e incubado durante 18 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Os controlos, positivo e negativo, foram estudados em

simultâneo com as amostras, em cada um dos ensaios. Após a incubação as tiras foram lavadas com PBS-Tween 20 e incubadas com imunoglobulina de coelho, anti-IgG ou anti-IgM humana conjugada com peroxidase (Dako) e diluída em PBS-Tween a 1:500, durante duas horas, à temperatura ambiente sob agitação.

Após a incubação com o conjugado, as tiras foram lavadas e mergulhadas no substrato de peroxidase 3,3-diaminobenzidine (um comprimido de ureia peroxidase e outro de tris-tampão dissolvidos em 5 ml de H₂O destilada - Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidine Tablet Sets DAB peroxidase; SIGMA), até aparecimento das bandas, o que correspondia a cerca de dez minutos. A reacção foi suspensa por imersão das tiras em água destilada.

Os soros que apresentaram reactividade para três das cinco proteínas TpN 15, TpN 17; TpN 37, TmpA, TpN47 (George *et al.* 1998c), foram considerados como reactivos.

3. Resultados

3.1. Comparação dos testes não treponêmicos

A reactividade dos testes não treponêmicos foi avaliada em 1231 soros, sendo o VDRL reactivo em 656/1231 (53,3%) e não reactivo em 575/1231 (46,7%), enquanto que o RPR apresentou reactividade em 604/1231 (49,1%), não a tendo demonstrado em 627/1231 (50,9%). A taxa de concordância entre os dois testes foi de 93,5%. Sessenta e seis dos 656 (10%) soros que apresentaram reactividade no VDRL e 14/575 (2,4%) dos que não a demonstraram no VDRL foram não reactivos e reactivos no RPR, respectivamente (Tabela 12 e Figura 10).

Tabela 12. Resultados obtidos com os testes VDRL e RPR

		VDRL		Total
		Não reactivo	Reactivo	
RPR	Não reactivo	561	66	627
	Reactivo	14	590	604
Total		575	656	1231

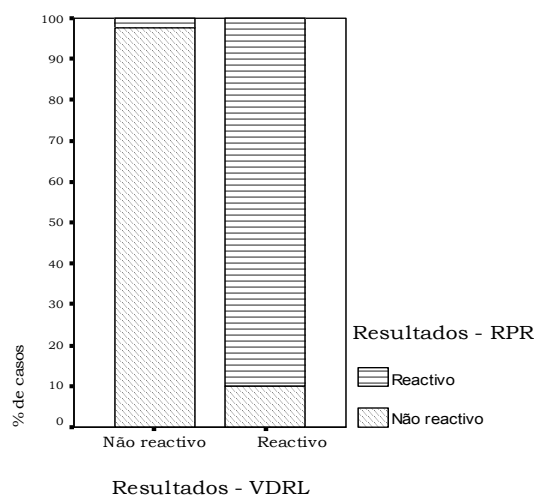


Figura 10. Comparação (%) dos resultados dos testes VDRL e RPR

Dos 66 soros reactivos no VDRL e não reactivos no RPR, quatro provinham de doentes sem história clínica, sem sintomatologia e sem reactividade serológica em nenhum outro teste para infecção a *T. pallidum*, pelo que foram considerados como nunca tendo tido sífilis, um foi reactivo nos testes treponémicos, cujo VDRL diminuiu após terapêutica pelo que se considerou como estágio de sífilis latente. Os restantes 61, também reactivos nos testes treponémicos, eram provenientes de indivíduos sem sintomas ou sinais de sífilis activa e que tinham efectuado terapêutica, pelo que foram considerados como doentes com sífilis tratada. Relativamente aos 14 doentes com soros reactivos no RPR e sem reactividade no VDRL e utilizando os mesmos critérios, cinco foram considerados como nunca tendo tido sífilis, um como tendo sífilis latente e os restantes oito com sífilis tratada.

Uma vez que, tal como mencionado anteriormente, o FTA-Abs-G é geralmente usado como teste padrão, foi efectuado estudo da sensibilidade e especificidade dos testes VDRL e RPR nos diferentes estádios da infecção, em doentes com história de sífilis correctamente tratada e em doentes sem sífilis (Tabela 13).

Tabela 13. Sensibilidade e especificidade dos testes VDRL e RPR em comparação com o teste FTA-Abs

	VDRL		RPR	
	Sensibilidade N°+vo/FTA- Abs+vo (%)	Especificidade N°-vo/FTA- Abs-vo (%)	Sensibilidade N°+vo/FTA- Abs+vo (%)	Especificidade N°-vo/FTA- Abs-vo (%)
Sífilis primária	57/62 (91,9%)	–	57/62 (91,9%)	–
Sífilis secundária	45/45 (100%)	–	45/45 (100%)	–
Sífilis latente	321/322 (99,7%)	–	321/322 (99,7%)	–
Neurossífilis	8/8 (100%)	–	8/8 (100%)	–
Sífilis tratada	191/393 (48,6%)	–	140/393 (35,6%)	–
Sem sífilis	–	360/388 (92,8%)	–	359/388 (92,5%)

Os dois testes apresentaram sensibilidades iguais nos vários estádios de sífilis, sendo de 91,9% na sífilis primária, 100% na sífilis secundária, 99,7% na sífilis latente e 100% na neurosífilis. Nos doentes com sífilis tratada a sensibilidade do VDRL foi de 48,6%, enquanto que no RPR foi de 35,6%.

A especificidade foi de 92,8% (360/388) para o VDRL e de 92,5% (359/388) para o RPR, correspondendo a uma taxa de falsa reactividade de 7,2% (28/388) no VDRL e de 7,5% (29/388) para o RPR.

3.2. Monitorização do resultado da terapêutica com os testes não-treponémicos

A monitorização após a terapêutica de doentes com sífilis deve ser orientada pela observação clínica e pela pesquisa de anticorpos por teste não treponémico com titulação, geralmente aos três, seis, 12 meses para os estádios de sífilis recente e até aos dois anos para os doentes com sífilis tardia e neurosífilis. Considera-se que a terapêutica teve sucesso quando se observa diminuição significativa no título do teste não treponémico (pelo menos em duas diluições em relação ao título inicial), ou quando o teste se torna não reactivo (seroreversão). A monitorização terapêutica dos doentes incluídos neste estudo foi efectuada, sempre que possível, aos três, seis e 12 meses, variando o número de doentes de acordo com as fases da sífilis e com o tempo de monitorização.

Nas Tabela 14, 15 e 16 estão descritos os resultados dos testes não treponémicos efectuados para controlo terapêutico. Foram monitorizados doentes com sífilis primária (21 aos três meses e 12 aos seis e 12 meses), sífilis secundária (15 aos três meses, nove aos seis e oito aos 12 meses), e sífilis latente (66 aos três, 50 aos seis e 40 aos 12 meses).

Aos três meses observou-se não existir diminuição significativa dos títulos dos testes VDRL e RPR respectivamente em 11/21 e 5/21 soros, na sífilis primária, assim como em 5/15 e 4/15 na sífilis secundária e em 46/66 e 45/66 na sífilis latente, existindo diminuição significativa no VDRL e no RPR em 9/21 e 11/21

na sífilis primária, em 10/15 e 11/15 na sífilis secundária, e em 18/66 e 17/66 na sífilis latente, respectivamente. A seroreversão foi observada para ambos os testes (VDRL e RPR) em 1/21 e 5/21 indivíduos com sífilis primária, e em 2/66 e 4/66 com sífilis latente, respectivamente.

Na sífilis primária e sífilis secundária não se observou diminuição significativa nos títulos dos testes de VDRL e RPR em 2/12 e 1/12 e em 3/9 e 1/9, respectivamente, aos seis meses após terapêutica, enquanto que o mesmo foi observado na sífilis latente em 20/50 e 19/50 e em 9/40 e 6/40 aos seis e 12 meses, para os testes de VDRL e RPR.

Tabela 14. Monitorização do resultado da terapêutica em doentes com sífilis primária

Sífilis primária	3 Meses		6 Meses		12 Meses	
	VDRL nº doentes /total (%)	RPR nº doentes /total (%)	VDRL nº doentes /total (%)	RPR nº doentes /total (%)	VDRL nº doentes /total (%)	RPR nº doentes /total (%)
Sem diminuição no	11/21 (52,4%)	5/21 (23,8%)	2/12 (16,7%)	1/12 (8,3%)	-	-
Com diminuição significativa	9/21 (42,9%)	11/21 (52,4%)	8/12 (66,7%)	7/12 (58,3%)	4/12 (33,3%)	3/12 (25%)
Seroreversão	1/21 (4,8%)	5/21 (23,8%)	2/12 (16,7%)	4/12 (33,3%)	8/12 (66,7%)	9/12 (75%)

Tabela 15. Monitorização do resultado da terapêutica em doentes com sífilis secundária

Sífilis secundária	3 Meses		6 Meses		12 Meses	
	VDRL nº doentes /total (%)	RPR nº doentes /total (%)	VDRL nº doentes /total (%)	RPR nº doentes /total (%)	VDRL nº doentes /total (%)	RPR nº doentes /total (%)
Sem diminuição no título	5/15 (33,3%)	4/15 (26,7%)	3/9 (33,3%)	1/9 (11,1%)	-	-
Com diminuição significativa	10/15 (66,7%)	11/15 (73,3%)	6/9 (66,7%)	7/9 (77,8%)	7/8 (87,5%)	5/8 (62,5%)
Seroreversão	-	-	-	1/9 (11,1%)	1/8 (12,5%)	3/8 (37,5%)

Tabela 16. Monitorização do resultado da terapêutica em doentes com sífilis latente

Sífilis latente	3 Meses		6 Meses		12 Meses	
	VDRL	RPR	VDRL	RPR	VDRL	RPR
	n° doentes /total (%)	n° doentes /total (%)	n° doentes /total (%)	n° doentes /total (%)	n° doentes /total (%)	n° doentes /total (%)
Sem diminuição no título	46/66 (69,7%)	45/66 (68,2%)	20/50 (40%)	19/50 (38%)	9/40 (22,5%)	6/40 (15%)
Com diminuição significativa	18/66 (27,3%)	17/66 (25,8%)	29/50 (58%)	26/50 (52%)	26/40 (65%)	23/40 (57,5%)
Seroreversão	2/66 (3%)	4/66 (6%)	1/50 (2%)	5/50 (10%)	4/40 (10%)	11/40 (27,5%)

Aos seis e 12 meses e para a sífilis primária houve diminuição significativa na reactividade dos títulos dos testes VDRL e RPR em 8/12 e 7/12 e em 4/12 e 3/12 respectivamente. O mesmo sucedeu na sífilis secundária para 6/9 e 7/9 e para 7/8 e 5/8, enquanto que na sífilis latente o mesmo tipo de resultado para os mesmos períodos e testes foi respectivamente de 29/50 e 26/50 e de 26/40 e 23/40.

A seroreversão foi observada na sífilis primária aos seis e 12 meses em 2/12 e 4/12 e em 8/12 e 9/12 respectivamente para os testes VDRL e RPR. Na sífilis secundária aos seis meses apenas se observou seroreversão em 1/9 e para o RPR enquanto que aos 12 meses aquela esteve presente em 1/8 e 3/8 para o VDRL e RPR, respectivamente. Para os mesmos períodos (seis e 12 meses) e para os casos de sífilis latente observou-se que 1/50 e 5/50 e em 4/40 e 11/40 apresentaram resultado negativo nos testes VDRL e RPR, respectivamente.

3.3. Avaliação dos testes não treponémicos em doentes infectados por VIH

Nos co-infectados por *T. pallidum*-VIH, têm sido referidos resultados falsamente positivos nos testes não treponémicos RPR e VDRL (Rompalo *et al.* 1992, Augenbraun *et al.* 1994, Rusnak *et al.* 1994), pelo que se avaliaram aqueles testes, num grupo de doentes co-infectados.

A avaliação da reactividade serológica dos testes RPR e VDRL foi efectuada em 899 dos 1312 doentes incluídos no estudo, uma vez que apenas naquele número de doentes se conseguiu obter informação sobre a existência ou não de infecção por VIH. Relativamente a estes indivíduos 249/899 (27,7%) estavam infectados por VIH e 650/899 (72,3%) não. Nestes foi diagnosticada infecção por *T. pallidum* em 308/650 (47,4%), enquanto que nos indivíduos com co-infecção por VIH, a infecção foi diagnosticada em 184/249 (73,9%) (Figura 11).

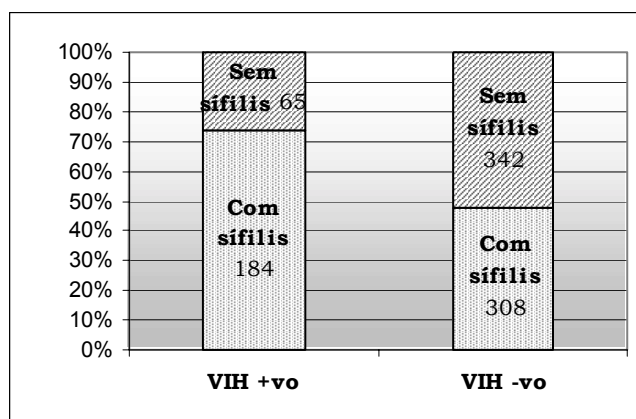


Figura 11. Distribuição das infecções por VIH e por *T. pallidum* na população estudada

Na população VIH negativa e relativamente aos testes não treponémicos em avaliação, 326/650 (50,2%) foram não reactivos e 324/650 (49,8%) reactivos no VDRL, enquanto que pela técnica de RPR 358/650 (55,1%) foram não reactivos e 292/650 (44,9%) apresentaram reactividade (Tabela 17). A taxa de concordância entre os dois testes foi de 94,2% (612/650).

Tabela 17. Resultados obtidos com os testes RPR e VDRL na população sem infecção por VIH

Sem infecção por VIH	VDRL		Total
	Não reactivo	Reactivo	
RPR	Não reactivo	323	358
	Reactivo	3	292
	Total	326	650

Trinta e dois dos 35 (91,4%) soros reactivos no VDRL e não reactivos no RPR, pertenciam a doentes com sífilis tratada e os restantes 3/35 (8,6%) a doentes sem infecção por *T. pallidum*. Dos três indivíduos com soros reactivos no RPR e não reactivos no VDRL, dois pertenciam ao grupo de sífilis tratada e o terceiro a um indivíduo sem sífilis.

Efectuado estudo para análise da falsa reactividade nesta população encontrou-se uma taxa de 2,6% (17/650) para o VDRL e de 2,3% (15/650) para o RPR.

Em relação aos testes não treponémicos, nos indivíduos com infecção pelo VIH, 55/249 (22,1%) soros não demonstraram reactividade pelo VDRL e 194/249 (77,9%) demonstraram-na, enquanto que pelo teste RPR 58/249 (23,3%) foram não reactivos e 191/249 (76,7%) reactivos (Tabela 18). A taxa de concordância entre os dois testes foi de 94,7% (236/249).

Tabela 18. Resultados obtidos com os testes RPR e VDRL na população com infecção por VIH

Com infecção por VIH		VDRL		Total
		Não reactivo	Reactivo	
RPR	Não reactivo	50	8	58
	Reactivo	5	186	191
	Total	55	194	249

Estudadas as divergências verificou-se que os oito (100%) soros reactivos pelo VDRL e não reactivos pelo RPR pertenciam ao grupo de doentes com sífilis tratada e os cinco reactivos no RPR e não reactivos no VDRL apresentaram as seguintes características: dois (2/5 – 40%) pertenciam ao grupo de indivíduos com sífilis tratada, dois (2/5 – 40%) nunca tinham tido infecção por *T. pallidum* e um (1/5 – 20%) estava em estágio de sífilis latente.

A taxa de falsa reactividade determinada para esta população foi de 6% (15/249) para o VDRL e de 6,4% (16/249) para o RPR.

Com o objectivo de verificar se haveria ou não associação estatisticamente

significativa entre a infecção por *T. pallidum* e por VIH, efectuou-se comparação entre a presença da infecção viral e a de sífilis. Efectuado estudo estatístico pelo teste do Pearson Chi-Square, com correcção pelo teste de Fisher, observou-se a existência de uma associação significativa entre as duas infecções ($p < 0,0001$)

3.4. Relação do teste RPR com a infecção por VIH e toxicodependência

Estudos anteriores têm demonstrado que a resposta serológica não treponémica pode estar alterada (falsa reactividade) tanto nos indivíduos toxicodependentes como nos indivíduos com infecção por VIH. No entanto não se sabe até que ponto cada uma destas situações por si só, contribui para a presença de reacção falsamente positiva, principalmente no que diz respeito à infecção por VIH, uma vez que esta se encontra frequentemente associada à toxicodependência. Neste estudo avaliou-se a associação entre a falsa reactividade do RPR, a toxicodependência e a infecção por VIH, tendo como objectivo saber se cada uma destas duas situações influenciaria a presença de reacções falsamente positivas nos testes não treponémicos.

Uma vez que no presente estudo o teste RPR mostrou ser tão específico e sensível como o VDRL, inclusive nos infectados por VIH, sendo mais fácil de executar e mais objectivo, decidiu-se utilizar apenas aquele teste nesta parte do trabalho.

Incluíram-se soros cedidos pela Unidade de Virologia, soros de uma população prisional de Tires e alguns soros do presente estudo, totalizando 736. Destes 306 eram provenientes de doentes com infecção por VIH, dos quais 122 (39,9%) eram também toxicodependentes e 430 não apresentavam infecção por aquele vírus, sendo 113 (26,3%) toxicodependentes (Figura 12).

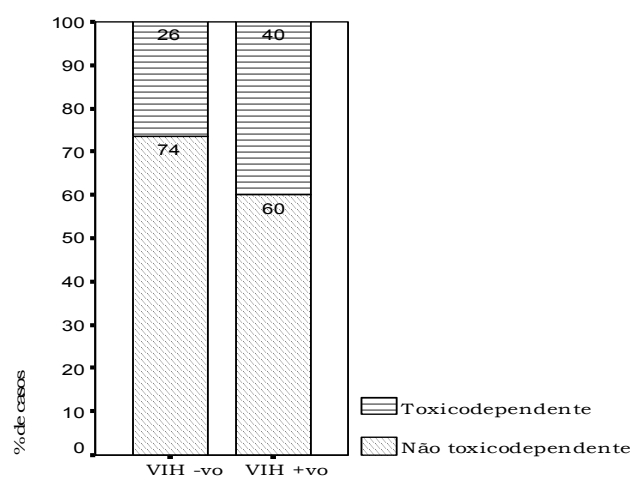


Figura 12. Distribuição da população estudada pela infecção por VIH e pela toxicodependência

Todos os soros foram estudados com os testes RPR e FTA-Abs, tendo-se obtido uma percentagem de falsa reactividade de 3,5% no total, sendo esta de 6,5% (20/306) nos indivíduos infectados por VIH e de 1,4% (6/430) nos indivíduos não infectados por este vírus (Tabela 19 e Figura 13).

Tabela 19. Resultados da falsa reactividade do teste RPR em relação à infecção por VIH e toxicodependência

	VIH +vo	VIH -vo	Total
	(%)	(%)	(%)
Toxicodependentes	11/122 (9%)	2/113 (1,8%)	13/235 (5,5%)
Não toxicodependentes	9/184 (4,9%)	4/317 (1,3%)	13/501 (2,6%)
Total	20/306 (6,5%)	6/430 (1,4%)	26/736 (3,5%)

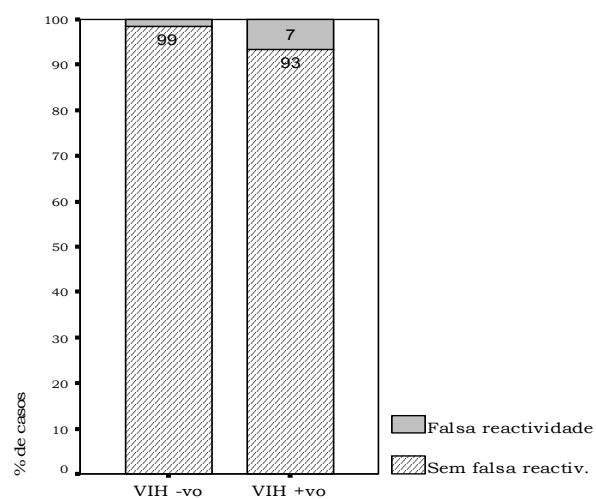


Figura 13. Distribuição da falsa reactividade do teste RPR em relação com a infecção por VIH (%)

Relativamente aos toxicod dependentes a percentagem de falsa reactividade foi de 5,5% (13/235) e nos não toxicod dependentes de 2,6% (13/501) (Tabela 19 e Figura 14).

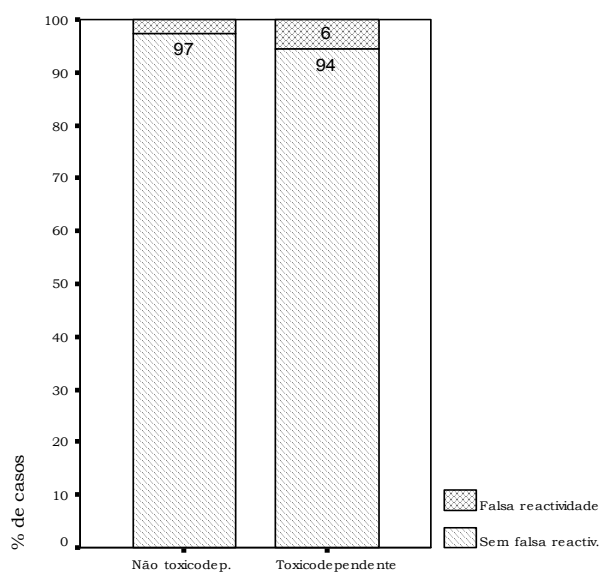


Figura 14. Distribuição da falsa reactividade do teste RPR em relação com a toxicod dependência (%)

Associando-se os dois factores (infecção por VIH e toxicodependência) em estudo, a falsa reactividade do teste RPR foi observada em 11/122 (9%) dos indivíduos VIH positivos/toxicodependentes, em 9/184 (4,9%) dos indivíduos VIH positivos e sem toxicodependência, em 2/113 (1,8%) indivíduos sem infecção pelo VIH e toxicodependentes e em 4/317 (1,3%) dos indivíduos VIH negativos sem toxicodependência.

Efectuado estudo estatístico pelo teste do Pearson Chi-Square observou-se associação significativa entre a infecção por VIH e a toxicodependência ($p < 0.001$), uma associação significativa entre infecção por VIH e a presença de falsa reactividade no RPR ($p < 0.001$) e embora existisse associação entre toxicodependência e falsa reactividade esta não foi estatisticamente significativa ($p = 0.004$)

3.5. Avaliação de uma técnica de hemaglutinação – TPHA

A reactividade do teste treponémico TPHA foi avaliada em 1309 soros, dos quais 872/1309 (66,6%) foram reactivos e 437/1309 (33,3%) não reactivos.

Na Tabela 20 encontram-se sintetizados os resultados obtidos com os testes, TPHA e RPR, comparados entre si e discriminados por grupos de doentes.

Como se pode verificar apenas no grupo de doentes com sífilis secundária há concordância total de resultados. A percentagem de resultados falsamente negativos pelo teste TPHA foi de 0,6% (8/1306) correspondendo a 2/62 (3,2%) de sífilis primária, 1/8 (12,5%) de neurosífilis e 5/335 (1,5%) de sífilis latente, com o teste RPR obtiveram-se resultados falso negativos em 0,5% (6/1306), dos quais 5/62 (8,1%) foram diagnosticados como sífilis primária e 1/335 (0,3%) como sífilis latente.

A falsa reactividade dos testes TPHA e RPR, apenas encontrada no grupo de doentes sem sífilis, foi de 0,3% (4/1306) e 2,5% (32/1306), respectivamente. Por outro lado, todos estes soros com falsa reactividade no teste não treponémico foram correctamente diferenciados pelo teste treponémico.

Tabela 20. Resultados obtidos com os testes RPR e TPHA no soro de indivíduos dos vários grupos estudados

Grupos estudados			TPHA	
			Não reactivo	Reactivo
Sem sífilis (418)	RPR	Não reactivo	382	4
		Reactivo	32	–
Sífilis primária (62)	RPR	Não reactivo	–	5
		Reactivo	2	55
Sífilis secundária (45)	RPR	Reactivo	–	45
Sífilis latente (335)	RPR	Não reactivo	–	1
		Reactivo	5	329
Neurosífilis (8)	RPR	Reactivo	1	7
Sífilis tratada (438)	RPR	Não reactivo	11	277
		Reactivo	4	146

A sensibilidade e a especificidade do teste TPHA foram calculadas utilizando-se o teste FTA-Abs como técnica padrão, sendo, respectivamente, de 97,6% e 97%, com taxa de concordância de 97,4% (Tabela 21).

Tabela 21. Resultados obtidos com os testes TPHA e FTA-Abs-G

		FTA-Abs-G		Total
		Reactivo	Não reactivo	
TPHA	Reactivo	859	13	872
	Não reactivo	21	416	437
Total		880	429	1309

Sensibilidade (859/880) – 97,6%

Especificidade (416/429) – 97%

Taxa de concordância (1275/1309) – 97,4%

Na análise das discrepâncias entre os dois testes, verificou-se que dos 21 soros não reactivos no teste TPHA e reactivos com a técnica FTA-Abs-G, 13 eram provenientes de doentes com sífilis tratada, dois de doentes com sífilis primária, um de doente com neurosífilis, sendo os restantes cinco de doentes com sífilis latente.

Em relação aos 13 soros reactivos pelo teste TPHA e sem reactividade no teste FTA-Abs, nove pertenciam a doentes com sífilis tratada e quatro ao grupo de indivíduos sem sífilis.

3.6. Avaliação de uma técnica de aglutinação – TPPA

Com a técnica de aglutinação TP.PA, foram estudados 449 soros.

Ao contrário do que é habitual com os testes treponémicos, há indícios, não confirmados, de que a técnica TP.PA poderia ser útil para avaliar a eficácia da terapêutica, tal como acontece com os testes não treponémicos. Assim, com esta técnica foi monitorizado o resultado da terapêutica em 54 doentes.

Comparação do TP.PA com os testes treponémicos clássicos – TPHA e FTA-Abs

Dos 449 soros estudados, 324 (72,2%) foram reactivos com o teste TPHA, 331 (73,7%) com o teste TP.PA e 336 (74,8%) com o teste FTA-Abs, enquanto que foram não reactivos 125 (27,8%) com o teste TPHA, 118 (26,3%) com o teste TP.PA e 113 (25,2%) com o teste FTA-Abs.

Na comparação dos testes TP.PA e TPHA (Tabela 22) o primeiro apresentou uma sensibilidade de 100%, uma especificidade de 94,4% e uma taxa de concordância de 98,9%.

Tabela 22. Resultados obtidos com os testes TP.PA e TPHA

		TPHA		
		Reactivo	Não reactivo	Total
TP.PA	Reactivo	324	7	331
	Não Reactivo	0	118	118
Total		324	125	449

Sensibilidade (324/324) – 100%

Especificidade (118/125) – 94,4%

Taxa de concordância (442/449) – 98,4%

Na comparação com o FTA-Abs (Tabela 23) obteve-se sensibilidade de 98,5%, especificidade de 100% e taxa de concordância de 98,8%.

Tabela 23. Resultados obtidos com os testes TP.PA e FTA-ABS

		FTA-ABS		
		Reactivo	Não reactivo	Total
TP.PA	Reactivo	331	0	331
	Não Reactivo	5	113	118
Total		336	113	449

Sensibilidade (331/336) – 98,5 %

Especificidade (113/113) – 100 %

Taxa de concordância (444/449) – 98,9 %

Entre os 449 doentes estudados o diagnóstico de sífilis primária foi feito em 28 destes. Visto que no estágio primário, os testes treponémicos se tornam reactivos mais precocemente, sobretudo o FTA-Abs, calculou-se a sensibilidade destes testes treponémicos nesta fase da sífilis, tendo-se obtido 100% (28/28) para o TP.PA e FTA-Abs e 89,3% (25/28) para o TPHA.

Monitorização do resultado da terapêutica

Na monitorização do resultado da terapêutica foi comparado o teste TP.PA com os testes RPR e TPHA, uma vez que o primeiro é um teste não treponémico habitualmente utilizado para este fim e o segundo é um teste específico semelhante ao TP.PA.

A grande maioria dos doentes em que o resultado da terapêutica não foi monitorizado, apresentava perfil clínico e serológico compatível com sífilis latente.

A totalidade de doentes monitorizados foi de 54, dos quais 22 foram acompanhados até aos 12 meses. Daqueles, foi diagnosticada sífilis primária em 10, sífilis secundária em 13 e sífilis latente em 31. Na globalidade, uma significativa diminuição no título de anticorpos no teste RPR (mínimo de duas diluições) seis meses após terapêutica foi observada em 30/54 (55,6%), enquanto que no teste TPHA esta foi de 14/54 (25,9%) e no TP.PA de 38/54 (70,4%). Até aos 12 meses esta situação foi registada em 15/22 (68,2%), 10/22 (45,5%) e em 19/22 (86,4%). A seroreversão observou-se apenas nos títulos de RPR e em 7/54 (13%) amostras, das quais duas aos seis meses e cinco aos 12 meses após a terapêutica.

Todos os doentes com o diagnóstico de sífilis primária (10) foram observados até aos seis meses e quatro até aos 12 meses (Tabela 24).

Tabela 24. Monitorização do resultado da terapêutica de doentes com sífilis primária aos seis e 12 meses com os testes RPR, TPHA e TP.PA

	RPR		TPHA		TP.PA	
	6 Meses	12 Meses	6 Meses	12 Meses	6 Meses	12 Meses
Sem diminuição no título	2 (20%)	0 (0%)	7 (70%)	3 (75%)	1 (10%)	0 (0%)
Com diminuição no título	8 (80%)	2 (50%)	3 (30%)	1 (25%)	9 (90%)	4 (100%)
Seroreversão	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	10	4	10	4	10	4

Aos seis meses 8/10 (80%) dos soros apresentaram diminuição significativa do título no teste RPR, 3/10 (30%) no teste TPHA e 9/10 (90%) no teste TP.PA. Todos os soros dos doentes observados aos 12 meses depois da terapêutica tinham, pelo menos, significativa diminuição no título do RPR e do TP.PA, embora o mesmo estivesse mantido no TPHA em três casos.

Os 13 doentes com diagnóstico de sífilis secundária foram seguidos até aos seis meses dos quais seis foram monitorizados até aos 12 meses (Tabela 25).

Aos seis meses, 10/13 (77%) apresentavam significativa diminuição no título do RPR, 5/13 (38,5%) no TPHA e 11/13 (84,6%) no TP.PA, enquanto que 3/13 (23,1%) registavam o mesmo título no RPR, 8/13 (61,5%) no TPHA e 2/13 (15,4%) no TP.PA.

Todos os soros dos doentes observados aos 12 meses apresentaram significativa diminuição no título do RPR e do TP.PA enquanto que dois o mantiveram no TPHA.

Tabela 25. Monitorização do resultado da terapêutica de doentes com sífilis secundária aos seis e 12 meses com os testes RPR, TPHA e TP.PA

	RPR		TPHA		TP.PA	
	6 Meses	12 Meses	6 Meses	12 Meses	6 Meses	12 Meses
Sem diminuição	3	0	8	2	2	0
no título	(23,1 %)	(0%)	(61,5%)	(33,3%)	(15,4%)	(0%)
Com diminuição	10	4	5	4	11	6
no título	(77 %)	(66,7%)	(38,5%)	(66,7%)	(84,6%)	(100%)
Seroreversão	0	2	0	0	0	0
	(0%)	(33,3%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Total	13	6	13	6	13	6

Trinta e um doentes com diagnóstico de sífilis latente foram monitorizados até aos seis meses depois da terapêutica, enquanto que apenas 12 o foram até aos 12 meses (Tabela 26).

Aos seis meses observou-se diminuição significativa no título do teste RPR em

12/31 (38,7%) doentes, sendo que 17/31 (54,8%) não registaram esta alteração. O estudo dos mesmos soros pelo teste TPHA não apresentou diminuição significativa em 25/31 (80,6%) doentes, sendo a mesma significativa em 6/31 (19,4%), enquanto que o título do TP.PA se manteve em 13/31 (42%) desses doentes e apresentou significativa diminuição em 18/31 (58,1%).

Em relação aos doentes observados até aos 12 meses, encontrou-se seroreversão no soro de 1/12 (8,3%) doente com o RPR, significativa diminuição no título deste teste em 9/12 (75%) doentes, no teste TPHA em 5/12 (41,7%) e com o teste TP.PA em 9/12 (75%).

Dois dos 12 (16,7%) doentes mantiveram o título no RPR, 7/12 (58,3%) no TPHA e 3/12 (25%) no TP.PA.

Tabela 26. Monitorização do resultado da terapêutica de doentes com sífilis latente aos seis e 12 meses com os testes RPR, TPHA e TP.PA

	RPR		TPHA		TP.PA	
	6 Meses	12 Meses	6 Meses	12 Meses	6 Meses	12 Meses
Sem diminuição no título	17 (54,8%)	2 (16,7%)	25 (80,6%)	7 (58,3%)	13 (42%)	3 (25%)
Com diminuição no título	12 (38,7%)	9 (75%)	6 (19,4%)	5 (41,7%)	18 (58,1%)	9 (75%)
Seroreversão	2 (6,5%)	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	31	12	31	12	31	12

3.7. Avaliação de uma técnica imunoenzimático – EIA

As técnicas imunoenzimáticas estão largamente difundidas no diagnóstico laboratorial de diversas patologias, sendo também utilizadas na pesquisa de anticorpos específicos de *T. pallidum*.

Neste estudo avaliou-se uma técnica imunoenzimática (EIA) para pesquisa de anticorpo anti-*T. pallidum*, com o objectivo de determinar a sua utilidade na

rotina do diagnóstico serológico de sífilis, nomeadamente no seu rastreio. Estudaram-se 441 soros provenientes de indivíduos distribuídos pelos seguintes grupos: 25 com sífilis primária, 25 com sífilis secundária, 179 com sífilis latente, 105 que apresentavam história de sífilis correctamente tratada no passado e 107 sem história clínica de sífilis. Estes 441 soros foram estudados, também, pelos testes RPR, TPHA e FTA-Abs. Com o teste RPR, 289/441 (65,5%) foram reactivos e 152/441 (34,5%) não reactivos e pelos testes TPHA, FTA-Abs e EIA 313/441 (71%), 324/441 (73,5%) e 322/441 (73%) foram reactivos e não reactivos 128/441 (29%), 117/441 (26,5%), 119/441 (27%), respectivamente.

Tendo como referência o teste TPHA (Tabela 27), a sensibilidade e a especificidade do teste EIA, foi de 100% e de 93%, enquanto que estas foram de 99,4% e 100% respectivamente, quando a referência foi o teste FTA-Abs-G (Tabela 28). A taxa de concordância entre o teste EIA e o TPHA foi de 98% e entre aquele e o FTA-Abs de 99,5%.

Tabela 27. Resultados obtidos com os testes EIA-G e TPHA

		TPHA		
		Reactivo	Não reactivo	Total
EIA	Reactivo	313	9	322
	Não Reactivo	0	119	119
	Total	313	128	441

Sensibilidade (313/313) – 100 %

Especificidade (119/128) – 93 %

Taxa de concordância (432/441) – 98 %

Tabela 28. Resultados obtidos com os testes EIA-G e FTA-Abs

		FTA-ABS		
		Reactivo	Não reactivo	Total
EIA	Reactivo	322	0	322
	Não Reactivo	2	117	119
	Total	324	117	441

Sensibilidade (322/324) – 99,4%

Especificidade (117/117) – 100%

Taxa de concordância (439/441) – 99,5%

O teste de rastreio ideal é aquele que tem a capacidade de permitir o diagnóstico etiológico o mais precocemente possível, tendo a capacidade de distinguir entre infecção recente e passada, devendo ainda detectar todos os casos de doença, ser negativo na sua ausência, sendo este comportamento encontrado em todas as fases da mesma.

Tendo estas premissas em conta determinou-se a sensibilidade dos testes RPR, TPHA, e EIA em cada um dos grupos de doentes atrás referidos (sífilis primária, sífilis secundária, sífilis latente e doentes com sífilis correctamente tratada), considerando-se o teste FTA-Abs como teste padrão (Tabela 29).

A especificidade de cada um dos testes foi determinada pelo estudo dos soros do grupo sem sífilis.

Tabela 29. Sensibilidade e especificidade dos testes RPR, TPHA e EIA-G em comparação com o teste FTA-Abs-G

	RPR		TPHA		EIA-G	
	Sensibilidade e Nº+vo/FTA- abs+vo (%)	Especificidade Nº-vo/FTA- abs-vo (%)	Sensibilidade e Nº+vo/FTA- abs +vo (%)	Especificidade Nº-vo/FTA- abs -vo (%)	Sensibilidade e Nº+vo/FTA- abs +vo (%)	Especificidade Nº-vo/FTA- abs -vo (%)
SP*	23/25 (92%)	–	22/25 (88%)	–	25/25 (100%)	–
SS*	25/25 (100%)	–	25/25 (100%)	–	25/25 (100%)	–
SL*	178/179 9 (99,4%)	–	178/179 (99,4%)	–	179/179 (100%)	–
ST*	55/95 (57,9%)	–	88/95 (92,6%)	–	93/95 (97,9%)	–
S/S *	–	95/107 (88,8 %)	–	107/107 (100%)	–	107/107 (100%)

*SP – Sífilis primária; SS – Sífilis secundária; SL – Sífilis latente; ST Sífilis tratada;

S/S – Sem Sífilis

No grupo de doentes com sífilis primária (25), a sensibilidade dos testes RPR, TPHA e EIA foi de 92% (23/25), 88% (22/25) e 100% (25/25), respectivamente. No grupo com sífilis secundária (25) a sensibilidade foi de 100% (25/25) para todos os testes, enquanto que nos doentes com sífilis latente (179) e sífilis tratada (105) a sensibilidade foi, respectivamente, de 99,4% (178/179) e 57,9% (55/95) quando utilizado o teste RPR, 99,4% (178/179) e 92,6% (88/95), quando utilizado o método de TPHA e 100% (179/179) e 97,9% (93/95) ao utilizar-se o teste EIA.

Quando os soros dos indivíduos sem evidência clínica de sífilis e teste FTA-Abs não reactivo foram avaliados pelo teste RPR, 12 apresentaram resultado reactivo. Os mesmos soros, quando estudados pelos testes TPHA e EIA foram não reactivos. Assim, a especificidade do teste RPR foi de 88,8% e a dos testes treponémicos TPHA e EIA foi de 100%.

A pesquisa de anticorpos específicos da classe IgM, tem sido referenciada como podendo auxiliar no diagnóstico de sífilis recente, pelo que se efectuou a detecção deste tipo de anticorpos utilizando um teste EIA-M e um teste FTA-Abs-M.

A detecção de anticorpos de tipo IgM efectuou-se nos soros de doentes em diferentes estádios da infecção (Tabela 30), em 25 soros de doentes com sífilis primária, em 25 com sífilis secundária e em 179 com sífilis latente.

Na globalidade, 65/229 (28,4%) soros foram reactivos, 150/229 (65,5%) não reactivos e 14/229 (6,1%) indeterminados pelo teste FTA-Abs-M, enquanto que com o teste EIA-M 75/229 (32,8%) foram reactivos, 150/229 (65,5%) não reactivos e 4/229 (1,7%) considerados indeterminados.

Em relação às diferentes fases da sífilis 18/25 (72%), 17/25 (68%) e 30/179 (16,8%) amostras apresentaram reactividade no FTA-Abs-M enquanto que 22/25 (88%), 19/25 (76%) e 34/179 (19%) foram reactivos pela técnica EIA-M, respectivamente, nas fases primária, secundária e latente da sífilis.

As diferenças observadas nos resultados dos dois testes não foram consideradas estatisticamente significativas. Os soros de um grupo de doentes com história de sífilis tratada foram também avaliados, tendo a pesquisa de anticorpos específicos de tipo IgM sido negativa, por ambas as técnicas.

Tabela 30. Resultados da pesquisa de anticorpos de tipo IgM específicos em diferentes estádios de sífilis pelos testes FTA-Abs-M e EIA-M.

	FTA-Abs-M			EIA-M		
	Reac./total (%)	Não reac./total (%)	Indet./total (%)	Reac./total (%)	Não reac./total (%)	Indet./total (%)
SP*	18/25 (72%)	1/25 (4%)	6/25 (24%)	22/25 (88%)	2/25 (8%)	1/25 (4%)
SS*	17/25 (68%)	6/25 (24%)	2/25 (8%)	19/25 (76%)	5/25 (20%)	1/25 (4%)
SL*	30/179 (16,8%)	143/179 (79,9%)	6/179 (3,4%)	34/179 (19%)	143/179 (79,9%)	2/179 (1,1%)
Total	65/229 (28,4%)	150/229 (65,5%)	14/229 (6,1%)	75/229 (32,8%)	150/229 (65,5%)	4/229 (1,7%)

* SP – Sífilis primária, SS – Sífilis secundária; SL – Sífilis latente; Reac. – Reactivo;

Indet. - Indeterminado

3.8. Avaliação de uma técnica Western blot

A técnica de Western blot para pesquisa de anticorpos específicos de tipo IgG foi avaliada pelo estudo de 800 soros, comparando-se os resultados obtidos com os que se obtiveram com o teste TPHA e com o teste FTA-Abs-G, uma vez que alguns autores referem esta técnica como mais específica sendo muitas vezes indicada como teste confirmatório ideal (Byrne *et al.* 1992, George *et al.* 1998c, Pâris-Hamelin *et al.* 1999).

Os 800 soros analisados foram reactivos em 658/800 (82,3%), 656/800 (82%) e 636/800 (79,5%) e não reactivos em 142/800 (17,8%), 132/800 (16,5%) e 164/800 (20,5%) pelas técnicas FTA-Abs-G, TPHA e Western blot, respectivamente (Tabela 31).

Tabela 31. Resultados obtidos com os testes FTA-Abs-G, TPHA e Western blot na globalidade dos soros estudados

	FTA-Abs-G	TPHA	Western blot - G
Reactivo	658/800 (82,3%)	656/800 (82%)	636/800 (79,5%)
Não reactivo	142/800 (17,8%)	132/800 (16,5%)	164/800 (20,5%)

Comparação com o teste TPHA

Na comparação do método Western blot com o teste TPHA (Tabela 32) obteve-se uma sensibilidade de 95,1% (624/656), uma especificidade de 91,7% (132/144) e uma taxa de concordância de 94,5% (756/800).

Tabela 32. Resultados obtidos com os testes Western blot e TPHA

		TPHA		
		Reactivo	Não reactivo	Total
WB-G	Reactivo	624	12	636
	Não reactivo	32	132	164
Total		656	144	800

Sensibilidade (624/656) – 95,1%

Especificidade (132/144) – 91,7%

Taxa de concordância (756/800) – 94,5%

Analizados os resultados não concordantes entre os dois testes, verificou-se que dos 32 soros reactivos pelo teste TPHA e não reactivos por técnica de Western blot, 28 pertenciam a doentes com sífilis tratada, um a doente com sífilis latente

e três provinham de indivíduos sem sífilis.

Os 12 soros não reactivos pelo teste TPHA, mas com reactividade pela técnica de Western blot apresentaram a seguinte distribuição: dois provieram de doentes com sífilis primária, três de doentes com sífilis latente, um de doente com neurosífilis e seis de doentes com sífilis tratada.

Comparação com o teste FTA-Abs-G

A sensibilidade e a especificidade obtidas para o teste Western blot, considerando-se o teste FTA-Abs como técnica padrão, foram respectivamente, de 96,4% (634/658) e de 98,6% (140/142) (Tabela 33), com uma taxa de concordância de 96,8% (774/800).

A análise das diferenças existentes entre os dois testes revelou que dos 24 soros reactivos pelo FTA-Abs-G e não reactivos pelo Western blot, 23 eram de doentes com sífilis tratada e o outro de um doente com sífilis primária, enquanto que os dois soros reactivos na técnica de Western blot e não reactivos no FTA-Abs eram de doentes com sífilis tratada.

Tabela 33. Resultados obtidos com os testes Western blot e FTA-Abs-G

		FTA-Abs-G		Total
		Reactivo	Não reactivo	
WB-G	Reactivo	634	2	636
	Não reactivo	24	140	164
Total		658	142	800

Sensibilidade (634/658) – 96,4%

Especificidade (140/142) – 98,6%

Taxa de concordância (774/800) – 96,8%

A comparação da técnica de Western blot com os testes TPHA e FTA-Abs-G foi feita, para os diferentes estádios da sífilis, cujos resultados são apresentados na Tabela 34.

Tabela 34. Resultados obtidos com os testes TPHA, Western blot e FTA-Abs-G, no soro de indivíduos dos vários grupos estudados

	TPHA		Western blot G		FTA-Abs-G	
	*Reac./total (%)	**Não reac./total (%)	Reac./total (%)	Não reac./total (%)	Reac./total (%)	Não reac./total (%)
Sífilis primária	58/60 (96,7%)	2/60 (3,3%)	59/60 (98,3%)	1/60 (1,7%)	60/60 (100%)	0/60 (0%)
Sífilis secundária	45/45 (100%)	0/45 (0%)	45/45 (100%)	0/45 (0%)	45/45 (100%)	0/45 (0%)
Neurossífilis	7/8 (87,5%)	1/8 (12,5%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)
Sífilis latente	307/310 (99%)	3/310 (1%)	310/310 (100%)	0/310 (0%)	310/310 (100%)	0/310 (0%)
Sífilis tratada	236/243 (97,1%)	7/243 (2,9%)	214/243 (88,1%)	29/243 (11,9%)	235/243 (96,7%)	8/243 (3,3%)
Sem sífilis	3/134 (2,2%)	131/134 (97,8%)	0/134 (0%)	134/134 (100%)	0/134 (0%)	134/134 (100%)

* Reac./total – número de amostras reactivas / total de amostras estudadas

** Não reac./total – número de amostras não reactivas / total de amostras estudadas

No que se refere às diferentes fases da doença todos os testes apresentaram sensibilidade de 100% nos doentes com sífilis secundária, o Western blot e o FTA-Abs-G na neurossífilis e sífilis latente e apenas o FTA-Abs-G na sífilis primária. Em relação a esta, o Western blot apresentou sensibilidade de 98,3% e o TPHA de 96,7%.

No grupo de doentes com sífilis tratada o Western blot foi o teste que apresentou menor taxa de reactividade (88,1%), enquanto que esta foi de 97,1% para o TPHA e de 96,7% para o FTA-Abs-G.

Por outro lado, ao contrário do TPHA e do mesmo modo que o FTA-Abs-G, o Western blot não apresentou falsa reactividade, sendo não reactivo em todos os doentes sem sífilis o que corresponde a uma especificidade de 100%.

Tal como anteriormente descrito, a pesquisa de anticorpos específicos de tipo

IgM, poderá ser uma estratégia a utilizar com a finalidade de confirmar o diagnóstico de sífilis precoce. Assim, efectuou-se a pesquisa deste tipo de anticorpos, utilizando as técnicas de FTA-Abs-M e Western blot M.

Esta pesquisa foi efectuada por ambas as técnicas em 933 soros, com os seguintes resultados: 133/933 (14,3%) soros reactivos, 786/933 (84,2%) não reactivos e 14/933 (1,5%) com resultados indeterminados com o teste FTA-Abs-M, sendo 166/933 (17,8%) reactivos e 767/933 (82,2%) não reactivos com o teste Western blot M. Todos os resultados indeterminados pelo teste FTA-Abs-M resultaram reactivos pelo teste de Western blot M.

Os resultados obtidos com ambas as técnicas nos soros dos doentes com diferentes estádios de sífilis encontram-se discriminados na Tabela 35.

Tabela 35. Resultados obtidos com os testes WB – M e FTA-Abs-M no soro de indivíduos dos vários grupos estudados

	Western blot M		FTA-Abs M		
	Reac*/total (%)	Não reac/total (%)	Reac*/total (%)	Não reac/total (%)	Indet*/total (%)
Sífilis primária	53/62 (85,5%)	9/62 (14,5%)	39/62 (62,9%)	17/62 (27,4%)	6/62 (9,7%)
Sífilis secundária	40/45 (88,9%)	5/45 (11,1%)	33/45 (73,3%)	10/45 (22,2%)	2/45 (4,4%)
Sífilis latente	67/332 (20,2%)	265/332 (79,8%)	56/332 (16,9%)	270/332 (81,3%)	6/332 (1,8%)
Neurossífilis	2/8 (25%)	6/8 (75%)	2/8 (25%)	6/8 (75%)	
Sífilis tratada	4/180 (2,2%)	176/180 (97,8%)	3/180 (1,7%)	177/180 (98,3%)	
Sem sífilis	0/306 (0%)	306/306 (100%)	0/306 (0%)	306/306 (100%)	

* Reac – reactivo; Indet. – indeterminado

No estudo de doentes com sífilis primária e secundária, o Western blot

apresentou reactividade de 85,5% (53/62) e de 88,9% (40/45), respectivamente, enquanto que com o FTA-Abs-M essa reactividade foi de 62,9% (39/62) e de 73,3% (33/45). A percentagem de reactividade foi igual nas situações de neurosífilis. Com o teste FTA-Abs-M observaram-se seis, duas e seis amostras com resultados indeterminados em indivíduos com sífilis primária, sífilis secundária e sífilis latente, respectivamente, as quais foram reactivas pela técnica de Western blot. De referir, ainda, a presença de anticorpos de tipo IgM em doentes com sífilis tratada, em quatro e três soros pelas técnicas Western blot e FTA-Abs-M, respectivamente, os quais correspondiam a doentes com sífilis recente, recentemente tratada.

4. Discussão e conclusões

Para avaliação dos diferentes testes serológicos utilizados no diagnóstico laboratorial de sífilis, estudaram-se soros de doentes, provenientes de consultas e serviços hospitalares já anteriormente referidos. Com base na história clínica e resultados dos testes de pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum*, estes doentes foram subdivididos em diferentes grupos, com a finalidade de se efectuar uma análise mais compreensível dos resultados obtidos.

A avaliação dos testes não treponémicos constitui a primeira parte deste capítulo, já que lhes são apontadas algumas limitações, como seja incidência relativamente elevada de resultados falsamente positivos e menor sensibilidade na sífilis primária e tardia. Por outro lado, os resultados falsamente negativos podem resultar, também, do fenómeno de prozona, ocorrendo em cerca de 1 – 2 % dos doentes com sífilis secundária (Spangler *et al.* 1964, Jurado *et al.* 1993). No presente estudo esta situação foi observada em 0,6% (8/1312) dos soros estudados de doentes, com diagnóstico de sífilis secundária.

Se bem que, tanto o VDRL como o RPR, sejam recomendados como testes não treponémicos a utilizar na rotina laboratorial para diagnóstico de sífilis (Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases 1999a, 199b, CDC 2002a), o VDRL apresenta algumas desvantagens em relação ao RPR (Tabela 36), isto é, por um lado, há necessidade de preparação diária do antígeno e da descomplementação dos soros, tendo que se executar uma técnica microscópica, ao contrário do RPR, cuja leitura do resultado é macroscópica.

Tabela 36. Características diferenciais entre os testes VDRL e RPR

VDRL	RPR
Descomplementação dos soros	Sem descomplementação dos soros
Antígeno preparado diariamente	Antígeno pronto a utilizar
Leitura microscópica	Leitura macroscópica

Por estas razões, sendo o RPR mais fácil de executar (a experiência anterior do

grupo de trabalho da Unidade de DST do IHMT parecia demonstrar que com esta técnica se obtinham resultados semelhantes aos do VDRL), e não havendo, praticamente, estudos de comparação entre estes dois testes, um dos objectivos desta tese foi a sua avaliação nos diferentes estádios da sífilis e a monitorização do efeito terapêutico. Se os resultados obtidos com os dois testes fossem comparáveis e uma vez que o RPR apresenta vantagens técnicas, deixaria de haver razão para a preferência de utilização do VDRL no diagnóstico de infecção a *T. pallidum*.

No presente estudo, e na globalidade, obteve-se uma taxa de concordância entre os dois testes de 93,5%, sendo maior o número de soros reactivos obtidos com o VDRL. Quando se analisaram os soros reactivos pela técnica de VDRL, não reactivos no teste RPR (66), quatro foram considerados falsos reactivos. Tratava-se de soros provenientes de indivíduos que não apresentavam sintomatologia e os testes específicos foram negativos. Sessenta e um eram de indivíduos que tinham sido tratados para sífilis, pelo que não tinham sífilis activa, e um pertencia a um doente com sífilis latente, razão pela qual era um falso negativo pela técnica de RPR.

Quanto às amostras (14) com reactividade no RPR, não reactivas no VDRL, e com os mesmos critérios acima mencionados, observou-se que cinco soros apresentaram falsa reactividade, oito pertenciam a doentes tratados para sífilis e um a um doente com sífilis latente não diagnosticada pelo VDRL (falso negativo por este teste).

No conjunto, os dados obtidos demonstraram taxa de concordância relativamente boa. Nos resultados discrepantes, cada teste originou um resultado falso negativo e o número de verdadeiros falso positivos foi praticamente igual (quatro para o VDRL e cinco para o RPR). A ausência de reactividade na sífilis latente verificou-se numa amostra para cada teste, o que corresponde a uma falsa negatividade de 0,08% (1/1231), idêntica à encontrada noutros estudos (Larsen *et al.* 1995, D'Errico *et al.* 1996).

Por outro lado, o facto de neste estudo existir um maior número de amostras reactivas no VDRL, consideradas negativas no RPR, e provenientes de doentes que efectuaram terapêutica correcta para sífilis, parece significar que a técnica de VDRL, tal como os testes treponémicos mantem a sua reactividade durante

mais tempo após a terapêutica, perdendo eficácia na monitorização do resultado da terapêutica. Este resultado parece pois demonstrar que o RPR diminui mais rapidamente após a terapêutica do que o VDRL, tendo-se revelado ser um teste mais eficiente na avaliação precoce da eficácia da mesma.

Para a avaliação da sensibilidade e especificidade dos dois testes não treponémicos nas diferentes fases da sífilis (sífilis primária, secundária, latente e neurosífilis), na sífilis tratada e nos indivíduos sem sífilis, utilizou-se o FTA-Abs-G como teste padrão.

Nos diferentes estádios da infecção os dois testes apresentaram sensibilidades iguais, sendo de 100% na sífilis secundária e neurosífilis, de 99,7% na sífilis latente e de 91,9% na sífilis primária. Sensibilidades semelhantes, variando de 92,3% a 100%, foram também obtidas por outros autores (Perryman *et al.* 1982, Pettit *et al.* 1983, White *et al.* 1989, Pope *et al.* 2000), os quais observaram, também, menor sensibilidade na sífilis primária. Com base neste tipo de resultados, isto é, menor sensibilidade no estágio primário, é recomendada a repetição dos testes serológicos, em todos os suspeitos de infecção por *T. pallidum*, oito a 15 dias depois de um resultado negativo, quando o quadro clínico é sugestivo de sífilis.

Nos doentes com sífilis tratada, e em comparação com o FTA-Abs, o VDRL parece diminuir mais lentamente que o RPR, o que confirma os resultados da análise na globalidade, originando maior proximidade entre a reactividade do VDRL e do FTA-Abs.

No que se relaciona com a especificidade, e quando o teste FTA-Abs foi considerado como teste padrão, aquela foi semelhante para os dois testes não treponémicos em avaliação, sendo de 92,8% para o VDRL e de 92,5% para o RPR. A especificidade encontrada neste estudo foi menor do que a descrita por Parham *et al.* (1984), Hambie *et al.* (1983) e Larsen *et al.* (1995), que obtiveram valores entre 96% e 98%. As diferenças entre os resultados aqui apresentados e os dos outros estudos poderão ser explicados por a população estudada ser constituída por muitos indivíduos infectados por VIH e toxicodependentes. A influência que estes factores podem ter na reactividade dos testes para pesquisa de anticorpos não treponémicos será ainda discutida neste capítulo.

Neste estudo a menor redução nos títulos obtida com o teste VDRL, em relação

ao RPR, após a terapêutica, levou a avaliar a descida dos títulos de anticorpos ou a ausência de reactividade nos testes não treponêmicos, através da observação dos seus títulos aos três, seis e 12 meses após a terapêutica nos vários estádios da sífilis. Assim, considerou-se que não tinha havido diminuição quando esta não foi significativa (duas ou mais diluições) no título inicial, diminuição significativa (com redução em duas ou mais diluições) e seroreversão no caso de se tornar não reactivo, de acordo com as normas do CDC (2002a) e WHO (2001). A diminuição e a seroreversão dos títulos foi mais evidente na sífilis primária e na sífilis secundária do que na sífilis latente, para ambos os testes, pelo que no presente estudo se confirma que neste estágio a monitorização após a terapêutica deve ser mais prolongada (Fiumara 1978, 1979, 1980a, 1986). O CDC (2002a) e outros autores (Egglesstone e Turner 2000, Brown e Frank 2003) recomendam que os doentes com sífilis primária, secundária e latente precoce devem ser vigiados até aos 12 meses, enquanto que os doentes com sífilis latente tardia ou de tempo indeterminado deverão ser reavaliados até aos 24 meses.

Por outro lado, a diminuição foi mais rápida e a seroreversão mais evidente com o RPR do que com o VDRL, pelo que se confirma ser aquele o mais indicado para a monitorização do resultado da terapêutica, se bem que Brown *et al.* (1985), em estudo anterior tenha mostrado que o RPR apresentou um tempo de declínio dos títulos mais prolongado. Por outro lado, Romawnosky *et al.* (1991) observaram descida contínua nos títulos do teste RPR, com taxas de seroreversão de cerca de 44% para a sífilis primária e de 13% para a sífilis latente um ano depois da terapêutica, enquanto que neste estudo, com o VDRL e RPR, esta foi respectivamente de 66,7% e 75% na sífilis primária e de 10% e 27,5% na sífilis latente. Tendo em conta os resultados obtidos por Romawnosky *et al.* (1991) verifica-se que no presente estudo se obteve uma taxa de seroreversão maior, quer na sífilis primária quer na latente, o que poderá estar relacionado com o estudo de populações diferentes ou com os títulos iniciais, antes da terapêutica.

A infecção por *T. pallidum* encontra-se muitas vezes associada com a infecção por VIH (Rogers *et al.* 1983, Castro *et al.* 1988, Hutchinson *et al.* 1991, MaCabe *et al.* 1993, Singh e Romawnosky 1999), pelo que nos doentes co-infectados os

testes não treponémicos podem colocar problemas de avaliação do resultado da terapêutica. Embora a maioria destes indivíduos pareça responder, do ponto de vista serológico, à infecção por *T. pallidum* de modo semelhante aos que não estão infectados pelo VIH, tal nem sempre sucede (Drabick e Tratmont 1990, Musher 1991), podendo surgir situações de falsa negatividade (Hicksn *et al.* 1987, Tikjob *et al.* 1991) e de falsa reactividade (Glatt *et al.* 1991, Rompalo *et al.* 1992, Augenbraun *et al.* 1994, Rusnak *et al.* 1994). Este último caso é mais frequente do que o primeiro (Singh e Romanowski 1999).

Neste capítulo e com o objectivo de avaliar as associações mencionadas no último parágrafo, compararam-se os testes não treponémicos em dois tipos de população, uma com infecção por *T. pallidum* e por VIH e outra apenas infectada com o primeiro agente. Assim, foi possível verificar que a infecção por *T. pallidum* foi mais comum na população infectada do que na sem infecção VIH, sendo a associação entre as duas infecções estatisticamente significativa ($p < 0.001$), tal como observado noutros estudos (Quinn *et al.* 1990, Ansell *et al.* 1994, Schoefer *et al.* 1996).

No estudo comparativo dos testes não treponémicos nestas duas populações, as taxas de concordância entre os dois testes foram semelhantes, sendo de 94,7% e 94,2% nos indivíduos infectados por VIH e naqueles sem infecção, respectivamente.

Tal como se observou anteriormente, o RPR parece ser o teste mais indicado para a monitorização do resultado da terapêutica, já que também nestas duas populações existiu descida mais rápida dos títulos com esta técnica.

Não havendo grandes diferenças entre as duas técnicas no grupo populacional infectado e não infectado por VIH, os resultados falsamente reactivos foram em maior número nos doentes com esta infecção viral, existindo associação estatisticamente significativa entre a infecção por VIH e a falsa reactividade de ambos os testes não treponémicos.

A falsa reactividade dos testes não treponémicos é um problema desde há muito referido e que se relaciona com diferentes situações crónicas ou agudas. Estas últimas associam-se com a gravidez, hepatite, mononucleose infecciosa, pneumonia viral, varíola, sarampo, malária, vacinação e outras doenças infecciosas virais, enquanto que a falsa reactividade crónica se tem associado a

doenças como a artrite reumatóide, lúpus eritematoso disseminado, alterações das imunoglobulinas, idade, lepra e neoplasias (Tuffanelli 1966, Catteral 1972, Hart 1986). A utilização de drogas injectáveis encontra-se, também, associada a maior taxa de falsa reactividade dos testes não treponémicos (Kaufman *et al.* 1974, Sterk 1988, Chaisson *et al.* 1989), tal como anteriormente foi referido para a infecção por VIH (Rompalo *et al.* 1992, Rusnak *et al.* 1994, Hernández-Aguado *et al.* 1998). A taxa de incidência de falsa reactividade na população em geral é cerca de 1%, valor inferior ao encontrado no presente estudo (2,3%). Este resultado pode estar relacionado com o tipo de população estudada, isto é de indivíduos predominantemente oriundos de países de expressão portuguesa infectados com malária, alguns doentes com lúpus eritematoso e grávidas. Por outro lado, sabe-se, também, que em Portugal a percentagem de hepatite C é elevada e que tem sido identificada a sua associação com falsa reactividade de testes não treponémicos (Thomas *et al.* 1994.).

Para explicar o maior número de falsos reactivos, que, geralmente, se encontra na população infectada por VIH tem-se colocado a hipótese de resultarem das alterações que ocorrem na produção de anticorpos, fenómeno que pode ser observado precoce ou tardiamente no curso daquela infecção (Lane *et al.* 1983, Pahwa *et al.* 1984) ou à presença de anticorpos anticardiolipina associada com a mesma (Canoso 1987).

No nosso País, e de modo semelhante a outros, a infecção por VIH é prevalente entre os toxicodependentes e sabendo-se que a toxicodependência, por si só, é factor de falsa reactividade, a associação dos dois factores combinados numa mesma população poderá ser responsável por maior taxa de falsa reactividade na população infectada por VIH. Não havendo nenhum estudo que clarificasse qual é o factor com maior influência nos resultados falsamente positivos, avaliou-se a presença de anticorpos anti-cardiolipina pela técnica de RPR, tendo em consideração a presença de infecção por VIH e a toxicodependência.

No presente estudo foi encontrada uma associação entre os resultados falsamente reactivos e infecção VIH associada à toxicodependência, tal como em estudos anteriores (Augenbraun *et al.* 1994, Rompalo *et al.* 1992, Joyanes *et al.* 1998). No entanto, quando se faz a análise estatística de cada um dos factores, esta só é estatisticamente significativa para a associação de falsa reactividade

com VIH, pelo que este vírus parece ser o factor que mais influencia este tipo de reacção.

Considerando apenas o VIH os dados obtidos encontram-se na generalidade de acordo com estudos anteriores (Rompalo *et al.* 1992, Joyanes *et al.* 1998), nos quais se verificou aumento das taxas de falsa reactividade associadas à infecção por VIH, se bem que os presentes números se aproximem mais dos encontrados por Rompalo *et al.* (4% nos indivíduos com infecção pelo VIH e de 0,8% nos VIH negativos), enquanto que os obtidos por Joyanes *et al.* (1998) foram de 15% nos indivíduos infectados por VIH e de 1,2% naqueles não infectados. Estas diferenças podem, eventualmente, ser devidas a que, tal como no primeiro caso, também a população do presente estudo provinha maioritariamente de doentes atendidos numa clínica de IST, enquanto que no segundo se tratava de uma população de um hospital geral em que 70% dos doentes com infecção por VIH eram, também, toxicodependentes. No entanto, nem aqueles autores nem outros até ao presente pesquisaram a influência de cada um dos dois factores em separado na obtenção dos resultados falsamente reactivos.

Se bem que se tenha verificado, também, uma relação entre a toxicodependência e a falsa reactividade, esta não foi uma associação estatisticamente significativa, ao contrário do obtido noutros estudos como o de Rusnack *et al.* (1994). Estes autores encontraram, apenas, relação significativa entre a falsa reactividade e a infecção por VIH nos indivíduos que eram, também, toxicodependentes. Uma vez que no presente estudo se encontrou uma associação significativa da infecção por *T. pallidum* com VIH, independentemente da toxicodependência, parece ser importante que perante uma falsa reactividade de um teste RPR e sem outra causa confirmada capaz de originar resultados falsamente reactivos, se efectue pesquisa de anticorpos anti-VIH, do mesmo modo que a pesquisa para este vírus, é efectuada em indivíduos com sífilis (Hooshmand 1972, Tratmont 1987, Katz e Berger 1989).

Os testes treponémicos são, geralmente, utilizados para confirmar a reactividade dos testes não treponémicos. Como anteriormente referido, essa confirmação torna-se necessária porque os testes não treponémicos apresentam, com alguma frequência, resultados falsamente positivos (Rusnack

et al. 1994, Nandwani e Evans 1995), o que na globalidade deste estudo se verificou em cerca de 2,3%.

No presente trabalho avaliaram-se diversos tipos de testes treponémicos, desde os mais utilizados na rotina laboratorial até uma técnica de Western blot “home made”, com a finalidade de determinar a sua utilidade no diagnóstico da infecção por *T. pallidum* e analisar a sua eficácia.

Porque, tal como referido anteriormente, não existe uma técnica padrão exequível para o diagnóstico serológico da sífilis, utilizou-se para esse fim o teste FTA-Abs, visto ser considerado como o mais sensível nos diferentes estádios da doença (Larsen *et al.* 1995).

A avaliação dos testes treponémicos iniciou-se com a técnica de hemaglutinação passiva (TPHA), por ser presentemente a técnica mais utilizada na rotina laboratorial. Embora a técnica de imunofluorescência indirecta tenha sido desenvolvida primeiro que o teste de TPHA, este tornou-se rapidamente o mais utilizado, por ser de execução simples, mais barato e não precisar de leitura ao microscópio de fluorescência. Isto torna-o mais objectivo, não necessitando de técnico experiente em microscopia de fluorescência.

Neste estudo, o método TPHA demonstrou boa sensibilidade (97,6%) e especificidade (97%), com valores que estão de acordo com os obtidos por outros autores (Jaffe *et al.* 1978a, Larsen *et al.* 1981, Kennedy 1998).

Na sua comparação com a técnica de RPR, verificou-se que os dois testes foram totalmente concordantes no que diz respeito ao estágio de sífilis secundária, o que é compreensível, uma vez que é o estágio da sífilis em que existem mais treponemas em circulação e em que, geralmente, todos os testes são positivos. Em relação aos resultados falsos negativos, traduzidos na maior ou menor sensibilidade dos testes em questão, o TPHA apresentou maior número de falsos negativos na globalidade, incluindo um resultado não reactivo numa amostra de soro de um doente com neurosífilis. Isto foi particularmente demonstrado no diagnóstico de sífilis latente em que no TPHA houve grande número de falso negativos 5/335 (1,5%), se bem que a maioria dos autores (Larsen *et al.* 1995, Kennedy 1998, Wicher *et al.* 1999) refira que o TPHA, ao contrário do RPR, permanece positivo durante mais tempo ao longo da história natural da sífilis e após a terapêutica. No entanto, esta situação acontece

sobretudo nos estádios tardios da infecção.

Em relação ao estágio de sífilis primária o RPR apresentou mais falsos negativos, o que não é de estranhar, já que se sabe que os testes treponémicos são os mais sensíveis neste estágio da infecção (Tramont 1990, Larsen *et al.* 1995, Singh e Romanowski 1999, Wicher *et al.* 1999).

No que diz respeito a resultados falsamente positivos, e como era de esperar (Catterall 1972, Thorton *et al.* 1987, Rusnak *et al.* 1994), foram em maior número com o teste RPR (2,4%) do que com o TPHA (0,3%).

Na comparação dos dois testes específicos mais utilizados na rotina laboratorial, o TPHA e o FTA-Abs, e considerando este como padrão, observou-se boa taxa de concordância (97,6%), tendo o TPHA apresentado sensibilidade de 97,6% e especificidade de 97,6%. Dos 21 casos em que o FTA-Abs foi positivo e o TPHA negativo, 13 eram de doentes com sífilis tratada, dois com sífilis primária, um com neurosífilis e cinco com sífilis latente. Daqui se pode concluir que o FTA-Abs identifica melhor os doentes com sífilis tratada, embora o TPHA também tenha identificado nove casos de sífilis tratada não reactivos no FTA-Abs. Este tipo de resultados é característico dos testes treponémicos (Johnson e Farnie 1994, Brown *et al.* 1985) mas, como consequência não distinguem entre infecção passada e recente, pelo que não se utilizam para o rastreio de infecção por *T. pallidum*.

Também, na sífilis primária, o FTA-Abs parece identificar mais casos de infecção do que o TPHA. De sublinhar que o FTA-Abs foi reactivo em todos os casos de sífilis primária atrás mencionados em que o TPHA e o RPR foram negativos, o que foi semelhante ao obtido por Larsen *et al.* (1981), que ao efectuarem a comparação destas duas técnicas (TPHA e FTA-Abs) obtiveram sensibilidade de 86,7% (26/30) e de 100% (30/30) nos indivíduos com sífilis primária. Estes resultados não são surpreendentes, sendo concordante com o já mencionado por outros autores, de que o FTA-Abs é, de todos os testes para detecção de anticorpos anti-*T. pallidum*, o primeiro a reactivar após a infecção se estabelecer (Shore 1967, Jaffe *et al.* 1978a, Dyckman *et al.* 1980).

A detecção de cinco casos de sífilis latente pelo FTA-Abs não reactivos com o teste TPHA deve ser, também, referida, pelo facto de ser generalizada a ideia de que o TPHA apresenta sensibilidade semelhante ao FTA-Abs nos estádios que

não de sífilis primária (Larsen *et al.* 1995). Num trabalho comparativo de técnicas, Zrein *et al.* (1995) encontraram 4/440 (0,9%) reacções falsamente negativas com um teste de hemaglutinação. Assim, e atendendo aos falsos negativos obtidos com esta técnica, quando em presença de situações clínicas sugestivas de sífilis, deverá efectuar-se um teste confirmatório por uma técnica de imunofluorescência. Importante de referir é o facto do TPHA não ter sido reactivo num caso de neurosífilis acima mencionado, o qual foi diagnosticado por um teste inespecífico (RPR) e por outro teste específico (FTA-Abs). Esta situação poderá à partida eliminar a probabilidade de se efectuar punção lombar por suspeita de neurosífilis, uma vez que o estudo do liquor só está recomendado quando a serologia é positiva. Deve realçar-se o facto de ter havido quatro casos de indivíduos sem sífilis cujos soros foram reactivos no TPHA e não reactivos no FTA-Abs, do que resulta uma taxa de falsa reactividade de 0,3% para o teste TPHA. Esta, em indivíduos aparentemente saudáveis, tem sido referida como inferior a 1%, e embora as causas sejam desconhecidas, em alguns casos foi relacionada com a presença de toxicodependência, doenças do colagénio e lepra (Jaffe *et al.* 1978a, Wentworth *et al.* 1978, Rein *et al.* 1980). Neste caso, não foi possível identificar a causa para este resultado e como os doentes não foram monitorizados, a repetição do teste não foi realizada.

Do estudo efectuado conclui-se que o TPHA demonstrou ser sensível e específico, permitindo diagnosticar a maioria dos doentes com infecção a *T. pallidum*, embora menos sensível e específico que o FTA-Abs.

Há alguns anos foi desenvolvido um novo teste de aglutinação em microplaca que utiliza um portador artificial de antigénio constituído por partículas de gelatina coradas em vez de eritrócitos, denominado TP.PA. Este é um teste de aglutinação passiva de princípio básico e execução semelhante ao TPHA (Deguchi *et al.* 1994), mas mais estável e de leitura mais simples. Devido ao novo portador de antigénio de partículas inertes são eliminadas as possíveis reacções heterófilas, que podem ocorrer quando utilizados eritrócitos (Pope e Fears 2000). Por outro lado, e à semelhança do FTA-Abs (Huber *et al.* 1983, Pope e Fears 2000) esta técnica parece ser mais sensível do que o TPHA nas situações de sífilis primária, sendo também mais fácil a sua leitura. Uma outra vantagem do teste seria, ao contrário dos outros testes treponémicos, a sua

eventual utilização na monitorização da terapêutica.

A avaliação do teste pelo cálculo da sua sensibilidade e especificidade, foi feita comparando-o com os testes da rotina laboratorial, TPHA e FTA-Abs. No teste em avaliação a sensibilidade e a especificidade foram elevadas e a taxa de concordância do TP.PA com o TPHA foi de 98,4% e com o FTA-Abs de 98,8%, o que está de acordo com os resultados obtidos por outros investigadores, que encontraram uma taxa de concordância de 97% (Pope *et al.* 2000) e 97,8% (Deguchi *et al.* 1994) com o TPHA. A sensibilidade do TP.PA foi de 100% e a especificidade de 94,4%, quando comparada com o TPHA sendo, respectivamente, de 98,5% e de 100%, na comparação com o FTA-Abs.

Analizando estes resultados, o TP.PA parece ser, pelo menos tão sensível como o TPHA e mais sensível que este, quando comparado com FTA-Abs (97,6%). Deve ser notado que os cinco casos reactivos no FTA-Abs e não reactivos no TP.PA estão relacionados com sífilis tratada, pelo que na realidade não são falsos negativos do TP.PA.

Em relação à especificidade fica claro, também, que o TP.PA é tão específico como o FTA-Abs e mais específico do que o TPHA na detecção de anticorpos anti-*T. pallidum*.

De modo semelhante a outros trabalhos efectuados (Schroeter *et al.* 1972, Deacon e Harris 1975), e como já referido e demonstrado anteriormente, o FTA-Abs é mais sensível que o TPHA na sífilis primária. O mesmo se aplica ao TP.PA já que a sua sensibilidade foi igual à do FTA-Abs-G nos doentes com sífilis primária, tendo demonstrado ser, nesta fase, mais sensível do que o TPHA, podendo, eventualmente, ser utilizado no diagnóstico da sífilis em estágio precoce.

A comparação dos títulos do TP.PA com os do RPR e do TPHA, em doentes monitorizados após terapêutica, teve a finalidade de se verificar a sua utilidade na avaliação do efeito da terapêutica. Só foi possível esta avaliação num pequeno número de doentes, uma vez que a população do presente estudo é, na sua maioria de indivíduos de grupos populacionais de alto risco de se infectarem com doenças sexualmente transmissíveis, que dificilmente regressam à consulta, sobretudo se aparentemente saudáveis.

A análise dos resultados obtidos na utilização deste teste para monitorizar a

terapêutica, na sua comparação com o RPR e o TPHA, demonstrou que um maior número de soros apresentou diminuição significativa dos títulos de anticorpos aos seis e 12 meses com a técnica TP.PA, seguindo-se o RPR. O menor número de casos com diminuição significativa do título obteve-se com o TPHA. No entanto, a seroreversão aos seis e 12 meses só foi observada com a técnica de RPR.

Ao considerar-se separadamente as várias fases da sífilis, em cada uma e na generalidade, o TP.PA demonstrou ser o teste em que houve maior número de amostras com diminuição significativa de anticorpos anti-*T. pallidum*. No entanto, no nosso estudo e de modo semelhante a outros estudos (Jaffe *et al.* 1978a, Fiumara 1979, 1980b, 1986), a seroreversão observou-se, apenas, num pequeno número de casos (7), a maioria ao fim de 12 meses e apenas com o teste RPR.

Os resultados obtidos sugerem que o teste TP.PA é adequado para utilização na rotina do diagnóstico laboratorial de sífilis, sendo tão sensível como o teste FTA-Abs na pesquisa de anticorpos na sífilis primária, tal como indicado por outros autores (Koboyashi *et al.* 1983, Deguchi *et al.* 1994, Pope *et al.* 2000, Young 2000) e útil para a monitorização do efeito terapêutico dos doentes com sífilis. Por outro lado, tem a vantagem de não ser necessária a utilização do microscópio de fluorescência, sendo menos subjectivo que o FTA-Abs e mais fácil de ler que o TPHA.

Assim, e também de acordo com Pope e Fears (2000), este teste poderá, com algumas vantagens, substituir o TPHA na rotina laboratorial, quer como teste confirmatório, quer em associação com o RPR para o rastreio de sífilis, como é usual nos países europeus (Young 2000).

A utilização da tecnologia imunoenzimática, aplicada à pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum*, iniciou-se em meados dos anos 70 (Veldkamp e Visser 1975). Presentemente muitos tipos de testes imunoenzimáticos estão disponíveis como método a utilizar no diagnóstico serológico da sífilis (Leferve *et al.* 1990, Young *et al.* 1992b, Nayar e Campos 1993, Hooper *et al.* 1994, Zrein *et al.* 1995, Ebel *et al.* 2000, Sambri *et al.* 2001a).

Este tipo de método tem mostrado algumas vantagens em relação aos testes mais correntes, uma vez que são fáceis e rápidos de executar e de leitura

objectiva. Embora de maior custo que as técnicas clássicas, sobretudo no estudo de pequeno número de amostras, a sua maior vantagem é a capacidade de processamento rápido quando estas são em grande número, para além da automatização da leitura, o que torna o resultado mais objectivo.

A sensibilidade dos diferentes testes imunoenzimáticos já estudados varia de 48,5%, a 100%, de acordo com o tipo de EIA, com o estágio da doença e com a prevalência da mesma (Borobio *et al.* 1990, Lefevre *et al.* 1990, Schmidt *et al.* 2000). No presente estudo e na globalidade dos doentes, a técnica aplicada apresentou boa sensibilidade (99,4%) quando comparada com o FTA-Abs, semelhante à de outros testes geralmente utilizados no diagnóstico laboratorial de sífilis. Resultados semelhantes aos obtidos (entre 95% a 99,6%) são referidos por outros estudos (Borobio *et al.* 1990, Silletti 1995, Reisner *et al.* 1997, Halling *et al.* 1999). Deve, no entanto, clarificar-se que, neste estudo, a sensibilidade do teste EIA só não foi maior porque o FTA-Abs foi positivo em dois casos de sífilis tratada. Como sublinhado anteriormente, não são verdadeiros falsos negativos.

A especificidade deste teste é mais elevada do que a do TPHA e é igual à do FTA-Abs (100%), embora ao comparar-se o teste EIA com o TPHA a especificidade daquele seja apenas de 93%. Isto deve-se ao facto de nove amostras negativas no TPHA e positivas no teste de EIA, corresponderem a falsos negativos do TPHA, uma vez que se relacionavam com casos de sífilis primária (3), sífilis latente (1) e de sífilis tratada (5). Na globalidade dos soros estudados a taxa de concordância foi, também, alta, sendo respectivamente de 99,5% e 98% com o FTA-Abs e o TPHA.

Quando se comparou a sensibilidade dos testes EIA, RPR e TPHA, nos vários estádios da infecção, utilizando o FTA-Abs como teste padrão, o primeiro mostrou alta sensibilidade em todos os estádios, inclusive na sífilis primária. Estes valores contrariam os resultados obtidos por outros autores que defenderam que o método apresentava baixa sensibilidade neste estágio (Lefevre *et al.* 1990, Schmidt *et al.* 2000). Na sífilis secundária, como esperado, os testes diagnosticaram 100% dos casos, tendo a EIA apresentado maior sensibilidade do que o TPHA e do que o RPR na sífilis primária, na sífilis latente e na sífilis tratada. Neste último grupo de doentes a sensibilidade obtida demonstra que a

técnica não apresenta nenhuma vantagem na capacidade de distinguir entre infecção tratada e não tratada, como sucede com o RPR.

A especificidade, analisada no grupo de doentes sem sífilis, foi de 100% para os testes EIA e TPHA e de 88% para o RPR, tendo o FTA-Abs como teste padrão. O teste de EIA parece ser, assim, tão específico como o FTA-Abs e o TPHA, e mais específico que o RPR, o que é vantajoso num teste de rastreio.

A presença de anticorpos de tipo IgM específicos é compatível com infecção recente a *T. pallidum* (Larsen *et al.* 1998), pelo que se decidiu verificar a capacidade de dois tipos de técnicas, uma de imunofluorescência indirecta e outra imunoenzimática (FTA-Abs-M e EIA-M) para a detecção desses anticorpos. Como era de esperar os anticorpos anti-*T. pallidum* de tipo IgM estavam presentes em maior número de amostras de doentes com sífilis primária do que nos doentes com sífilis secundária. As amostras de doentes com sífilis latente apresentaram uma menor reactividade para anticorpos de tipo IgM para ambos os testes, pelo que parece que ao longo da história natural da sífilis as IgM vão diminuindo. No entanto, ambos os testes estudados não tiveram a capacidade de demonstrar todos os casos de sífilis primária como seria desejável.

Comparando-se o teste ELISA-M com o FTA-Abs-M, o número de amostras indeterminadas foi menor com a técnica EIA do que com o FTA-Abs-M, parecendo que a maioria destas amostras eram na realidade reactivas. Tal pode ser devido à subjectividade do FTA-Abs, uma vez que a fluorescência é por vezes difícil de interpretar. De notar que não se encontraram anticorpos anti-*T. pallidum* de tipo IgM por nenhuma das técnicas nos doentes com história de sífilis tratada, o que associado à grande frequência da presença desse tipo de anticorpos nos indivíduos com sífilis primária e sífilis secundária, demonstra a utilidade do teste EIA como marcador de sífilis recente.

O teste EIA estudado parece ser uma alternativa aos testes treponémicos mais utilizados na detecção de anticorpos anti-*T. pallidum*, incluindo os de tipo IgM, visto ter apresentado especificidade e sensibilidade semelhante aos mesmos, em todos os estádios da infecção. Isto é, particularmente, verdadeiro quando se compara o teste EIA com o FTA-Abs, considerado o teste mais sensível e mais específico no diagnóstico laboratorial de sífilis. O teste EIA apresentou, também, sensibilidade semelhante ao RPR, tendo ainda a vantagem de não apresentar

resultados de falsa reactividade. Parece, assim, ser uma técnica que poderá ser utilizada como técnica de rastreio, uma vez que é simples, de leitura objectiva e facilmente automatizável. Isto mesmo tem vindo ultimamente a ser recomendado por alguns autores, como alternativa ao rastreio utilizando a combinação de um teste não treponémico com um teste treponémico, sobretudo em populações com baixa prevalência de infecção (Egglestone e Turner 2000, Brwon e Frank 2003).

A comparação dos resultados obtidos entre a técnica de Western blot e as técnicas clássicas habituais permitiu reconhecer que a técnica de Western blot G executada se aproximou mais do teste FTA-Abs-G. Em relação a este apresentou sensibilidade de 96,4% e especificidade de 98,6%, enquanto que relativamente ao TPHA aquelas foram de 95,1% e 91%, respectivamente. Outros autores obtiveram resultados semelhantes com sensibilidades e especificidades de 91,7% e 92% (Byrne *et al.* 1992), 96,6% e 99,5% (Ebel *et al.* 2000) na comparação com o FTA-Abs, enquanto que estas foram de 97,1% e 96,1% e de 86% e 100% na comparação com o TPHA (Marangoni *et al.* 1999, Sambri *et al.* 2001b).

Ao analisar-se os resultados não concordantes entre o Western blot G e o TPHA obtidos neste estudo chega-se à conclusão que o Western blot G diagnosticou mais seis casos de sífilis que o TPHA e que, por outro lado, não mostrou reactividade em 28 casos de sífilis tratada, nos quais o TPHA foi reactivo. Poderá ser mais útil na monitorização terapêutica, sendo não reactivo nos doentes já tratados e portanto sem sífilis.

Nos doentes com resultados discrepantes entre o Western blot e o FTA-Abs, houve apenas o caso de um soro de um doente com sífilis primária não reactivo pelo Western blot G e reactivo pelo FTA-Abs, sendo os restantes resultados em desacordo observados no grupo de doentes tratados, na sua maioria reactivos nos testes TPHA (28) e FTA-Abs (23).

A avaliação destas três técnicas permitiu verificar que existiu concordância total de resultados entre o Western blot e o FTA-Abs-G na sífilis secundária, neurosífilis e sífilis latente. O primeiro destes testes diagnosticou menos um caso de sífilis primária, mas é mais sensível que o TPHA, pois confirmou casos de doença activa que se tinham revelado negativos no teste TPHA.

Sambri *et al.* (2001b) obtiveram, também, uma menor sensibilidade do teste TPHA na sífilis primária quando comparado com o método Western blot, tendo identificado 49 soros reactivos por TPHA e 55 por Western blot, num total de 64 com aquele diagnóstico, e uma taxa de concordância de 84,4%. Marangoni *et al.* (1999), por outro lado, encontraram sensibilidade e especificidade do método Western blot em relação ao TPHA de 86% e 100%, respectivamente, e de 88,5 e 98%, respectivamente, em relação ao FTA-Abs, em doentes com o diagnóstico clínico de sífilis recente.

Neste trabalho, a especificidade foi de 100% para o FTA-Abs e para o Western blot. De acordo com os resultados obtidos, o método de Western blot parece ser uma técnica tão sensível e específica quanto o FTA-Abs na globalidade e nos diferentes estádios de doença activa em conformidade com o anteriormente referido por outros autores (Dobson 1988, Byrne *et al.* 1992, Meyer *et al.* 1994, George *et al.* 1998, Sambri *et al.* 2001b). Por outro lado, apresenta a vantagem da visualização directa da reacção antigénio-anticorpo, enquanto que o FTA-Abs é mais subjectivo. Interessante, foi o achado da menor reactividade do teste de Western blot no grupo de doentes com sífilis tratada. Neste grupo, esta técnica foi negativa em 12% dos casos, enquanto que o TPHA o foi em 3,3% e o FTA-Abs em, apenas, 2,9%. Aparentemente, os anticorpos para as bandas mais específicas, utilizadas na discriminação da reactividade do Western blot, parecem diminuir rapidamente, não sendo a técnica tão sensível como as de TPHA e FTA-Abs aos anticorpos residuais ou cicatriciais (Pâris-Hamelin *et al.* 1999). Por outro lado, Ijsselmuiden *et al.* (1989b) monitorizaram a resposta à terapêutica, relativamente à reactividade para a proteína TmpA (45kDa) por uma técnica imuno-enzimática e observaram que os anticorpos anti-proteína TmpA diminuíam. Parece que este não será caso único, já que a descida no título de anticorpos para outras proteínas antigénicas foi observada em doentes tratados, quando se utilizaram técnicas de Western blot (Moskophidis e Muller 1984a, 1984b, Baker-Zander *et al.* 1986).

A técnica de Western blot para pesquisa de anticorpos específicos de tipo IgM é idêntica à utilizada para a pesquisa de anticorpos de tipo IgG, substituindo-se o conjugado IgG por um IgM específico da cadeia μ (Sanchez *et al.* 1989, Nogard 1993, Meyer *et al.* 1994,).

As imunoglobulinas de tipo IgM surgem, em geral, no início da resposta humoral a um antígeno, persistindo por pouco tempo. No caso de infecção por *T. pallidum*, a pesquisa de anticorpos de tipo IgM por Western blot tem sido dirigida, sobretudo, para o diagnóstico de sífilis congênita (Sanchez *et al.* 1993, Schmidt *et al.* 1994), enquanto que para o diagnóstico de sífilis adquirida no adulto não tem sido muito utilizada ou estudada. Apesar disso, alguns autores determinaram que a sua presença poderia, eventualmente, contribuir para o diagnóstico de sífilis recente, para controlo terapêutico e para a vigilância após contacto de risco (O'Neill e Nicol 1972, Willkinson e Rodin 1976, Lefevre *et al.* 1983 e 1990, Pedersen *et al.* 1989). De salientar que embora a presença de anticorpos específicos anti-*T. pallidum* de tipo IgM sejam prova de doença activa (Muller 1986), a sua ausência não significa que a doença não esteja em curso (Pedersen *et al.*, 1982 Lefevre *et al.* 1983). Para a pesquisa destes anticorpos têm sido utilizadas diversas técnicas, (desde a imunofluorescência a técnicas imuno-enzimáticas e de Western blot).

Neste estudo, e comparativamente ao FTA-Abs-M, o método Western blot M mostrou maior sensibilidade, tendo existido 34 soros em que não houve concordância. Dos 33 soros não reactivos pelo FTA-Abs-M e reactivos pelo Western blot M, 32 eram de doentes com sífilis activa, correspondendo apenas um caso a sífilis tratada. Do exposto pode concluir-se que além de parecer mais sensível que o FTA-Abs parece também ser mais sensível nos casos de sífilis recente sintomática. No estudo dos anticorpos específicos de tipo IgM pela técnica de Western blot foram confirmados os casos que na técnica FTA-Abs-M foram considerados duvidoso ou indeterminados, com demonstração de reactividade pela técnica de Western blot M. Ambos os métodos mostraram ser bastante específicos, não se tendo obtido nenhum resultado reactivo no grupo de indivíduos sem sífilis. Pâris-Hamelin *et al.* (1999) demonstraram que a técnica Western blot M era mais sensível (reactiva em 4/10) que o teste FTA-Abs-M (3/10), o que está em conformidade com o presente estudo.

Assim, a técnica de Western blot parece ser bastante objectiva, sensível e específica, já que são pesquisados anticorpos dirigidos às proteínas de *T. pallidum*, sendo que o teste Western blot M permitiu a confirmação dos resultados duvidosos obtidos com a técnica de FTA-Abs-M. No entanto

apresenta a desvantagem da preparação do antígeno de *T. pallidum* que, para além de ser laboriosa, necessita da utilização de animais de biotério. Porém, estão já a ser utilizadas proteínas recombinantes, que têm apresentado resultados semelhantes às da técnica de Western blot com extracto de *T. pallidum* (Sato *et al.* 1999, Sambri *et al.* 2001b, Van Voorhis *et al.* 2003), as quais poderão ultrapassar essas desvantagens.



Capítulo 3. Pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* no liquor

1. Introdução

A neurosífilis desenvolve-se na sequência da invasão do sistema nervoso central por *T. pallidum*, afectando cerca de 6,5% dos indivíduos infectados não tratados (Larsen *et al.* 1998).

A patogenia da infecção por *T. pallidum* no sistema nervoso central está relacionada com a multiplicação local dos treponemas (Fitzgerald 1981). Embora se possam desenvolver sintomas neurológicos de sífilis durante o estágio de sífilis secundária (meningite sífilítica), a neurosífilis é sobretudo uma complicação da sífilis tardia, apesar de, actualmente, poder ocorrer mais precocemente, nos primeiros anos após a infecção inicial, nomeadamente em indivíduos infectados por VIH (Larsen *et al.* 1998).

Muitos dos conhecimentos actuais da história natural da sífilis e das suas manifestações clínicas, baseiam-se nos estudos efectuados após a identificação de *T. pallidum* por Schaudinn e Hoffman em 1905 e, ainda nos realizados por outros autores já na era da penicilina como terapêutica eficaz, com o consequente declínio da incidência da infecção e da morbilidade (Hutchinson e Hook 1990).

Antes da utilização da penicilina a infecção era muito comum e a terapêutica, geralmente com arsenicais e ou bismuto, era tóxica deixando sequelas graves. Embora na época pré-penicilina a complicação com maior mortalidade e morbilidade fosse a sífilis cardiovascular, a neurosífilis era também uma complicação grave, originando, nos anos 20 do século passado, cerca de 20% das admissões nas instituições psiquiátricas. Nessa época foi descrito um grande número de casos de envolvimento do sistema nervoso central, desde as formas assintomáticas, reconhecidas, apenas, nas alterações dos exames laboratoriais do liquor até às formas sintomáticas e irreversíveis (Simon 1985, Hutchinson e Hook 1990, Hook e Marra 1992).

Após os estudos de Moore e Hopkins (1936 – citado por Hook e Marra 1992),

defendendo que os doentes com sífilis assintomática e alterações do liquor (pleiocitose, aumento na concentração de proteínas ou teste serológico reactivo) apresentavam maior risco de desenvolvimento subsequente de neurosífilis sintomática do que os que não tinham aquelas alterações, foi tomada a decisão de tratar de acordo com os resultados da punção lombar (Hook 1994, Swartz *et al.* 1999).

Naquela época, como ainda hoje, os objectivos do estudo do liquor são os de orientar a terapêutica, de modo a prevenir o desenvolvimento da neurosífilis clinicamente aparente.

Após a introdução da penicilina e sobretudo da penicilina de acção prolongada, a incidência da sífilis e consequentemente da neurosífilis, diminuíram consideravelmente (Hutchinson e Hook 1990, Musher *et al.* 1990). Contudo, nas últimas décadas tem vindo a ser observado aumento da infecção a *T. pallidum* por todo o Mundo (Rompalo 2001a).

T. pallidum invade o sistema nervoso central precocemente no decurso da infecção sífilítica em muitos doentes, apesar de nem todos desenvolverem alterações do liquor ou doença do sistema nervoso central (Lukehart *et al.* 1988, Katz e Berger 1989).

Após a invasão inicial do liquor, a infecção treponémica não tratada ou inadequadamente tratada, pode resolver espontaneamente ou evoluir para meningite assintomática ou meningite sífilítica aguda (Singh e Romanowski 1999, Swartz *et al.* 1999). A seguir a essa fase inicial, a doença pode manter-se assintomática ou progredir para os estádios tardios de sífilis meningo-vascular, tabes dorsalis ou paralisia.

Nas últimas décadas, as apresentações clínicas pouco usuais e de rápida progressão nos doentes com co-infecção pelo VIH, levou à colocar a hipótese desta infecção viral poder alterar a história natural da sífilis (Johns *et al.* 1987, Berry *et al.* 1987, Musher *et al.* 1990, Katz *et al.* 1993).

Tal como anteriormente referido, durante os anos de 1980 e 1990 a neurosífilis pareceu ressurgir, tendo sido relatados numerosos casos, de aparecimento mais precoce na evolução da doença, entre os indivíduos com infecção pelo VIH (Simon 1985, Markovitz *et al.* 1986, Berry *et al.* 1987, Johns *et al.* 1987, Katz e Berger 1989, Hook 1989, Berger 1991). Em associação a este aumento

constatou-se a existência de um desvio na apresentação clínica da mesma, isto é, das formas tardias parenquimatosas de “tabes dorsalis” e de paralisia geral, para o tipo de manifestações que ocorrem mais precocemente, como é o caso da sífilis meníngea ou da sífilis meningovascular (Burke e Schaberg 1985, Musher *et al.* 1990, Dowell *et al.* 1992, Gordon *et al.* 1994, Flood *et al.* 1998).

Diversos estudos têm comprovado maior prevalência da neurosífilis nos indivíduos co-infectados por *T. pallidum* e VIH (Katz e Berger 1989, Berger 1991, Gue *et al.* 1993, Bordón *et al.* 1995, Schofer *et al.* 1996, Flood *et al.* 1998).

O diagnóstico correcto de neurosífilis torna-se pois cada vez mais importante, sobretudo devido às implicações terapêuticas, sabendo-se que a penicilina G benzatínica não atinge concentrações bactericidas no liquor, sendo necessária a utilização de outras formulações de penicilina, como por exemplo, a penicilina G aquosa ou a penicilina procaínica em associação com o probenecid (Yoder 1975, Mohr *et al.* 1976, Polnikorn *et al.* 1980, Ducas e Robson 1981, Van der Valk *et al.* 1988, CDC 2002a).

Larsen *et al.* (1998) definem como critérios de diagnóstico definitivo de neurosífilis, a presença de um teste treponémico reactivo no soro associado a um teste VDRL reactivo no liquor ou à identificação de *T. pallidum* no mesmo. O diagnóstico presuntivo fundamenta-se na associação do teste treponémico reactivo no soro, com a presença de sintomas e sinais clínicos de neurosífilis, ou exame citoquímico do liquor alterado, como aumento do número de leucócitos (> 5 células mononucleadas/mm³) e/ou aumento na concentração de proteínas (> 45 mg/dl), não sendo identificadas outras causas para estas alterações.

No entanto, estes critérios colocam alguns problemas, já que não existe um teste padrão para o diagnóstico laboratorial da neurosífilis (Lukehart *et al.* 1988). O teste de VDRL apresenta grande especificidade, pelo que a sua reactividade no liquor se considera como evidência de neurosífilis (Larsen *et al.* 1998, CDC 2002a), mas, infelizmente, apresenta baixa sensibilidade (22 a 69%), mesmo nos casos de neurosífilis sintomática (Sparling 1971, Hooshmand *et al.* 1972, Jaffe e Kabins 1982, Burke e Scaberg 1985) podendo existir resultados falsamente negativos por aquele teste. Embora raramente, a falsa reactividade

pode, também, ocorrer, sobretudo devido à contaminação do liquor com sangue durante a colheita (Escobar *et al.* 1970, Izzat *et al.* 1971, Davis e Sperry 1979, Hart 1986).

Por outro lado, as alterações do exame citoquímico do liquor são inespecíficas, relacionando-se com o processo inflamatório do sistema nervoso central e podem ser causadas por exemplo, pela infecção por VIH (Luger *et al.* 1981, Hook 1994, Larsen *et al.* 1998). Na co-infecção torna-se, assim, mais complicada a valorização por si só das alterações do exame citoquímico do liquor.

Alguns investigadores têm sugerido que os testes treponémicos FTA-Abs e TPHA seriam mais sensíveis que o teste VDRL no diagnóstico de infecção a *T. pallidum* do sistema nervoso central, mas esse critério não é aceite por todos (Kasatiya e Birry 1980, Hart 1986, Davis e Schmitt 1989, Hook e Marra 1992), uma vez que a presença de anticorpos específicos reactivos no liquor poderia resultar da difusão passiva de anticorpos treponémicos do sangue para o liquor, e não da infecção do sistema nervoso central (Jaffe e Kabins 1982). No entanto, um teste de FTA-Abs negativo no liquor tem sido utilizado para excluir o diagnóstico de neurosífilis (Sparling 1971, Jaffe *et al.* 1978b, Larsen *et al.* 1995, Marra *et al.* 1995), uma vez que é mais sensível embora menos específico do que o VDRL.

Todas estas questões e controvérsias fazem com que o diagnóstico de neurosífilis seja problemático, sobretudo nos indivíduos com infecção por VIH, nos quais, quando o VDRL é negativo, a inexistência de testes de diagnóstico dificulta a diferenciação entre doença neurológica por *T. pallidum*, por VIH ou, ainda, por outros agentes patogénicos do sistema nervoso central, que muitas vezes ocorrem nestes doentes.

A punção lombar está indicada em doentes com sífilis, na presença de sintomas e de sinais neurológicos e/ou oftálmológicos, na sífilis terciária, no insucesso terapêutico e na sífilis congénita (CDC 1998, 2002a). No caso de co-infecção por VIH e *T. pallidum* era recomendado, pelo CDC (1993a), punção lombar a todos os doentes para exclusão de diagnóstico de neurosífilis. No entanto, actualmente, recomenda-se que o exame do liquor seja praticado apenas, nos casos de sífilis latente tardia ou de sífilis com duração indeterminada (CDC 1998, 2002a), já que muitas vezes as alterações do liquor

na sífilis recente ocorrem independentemente da infecção por VIH (Lukehart *et al.* 1988, Rolfs *et al.* 1997).

Em indivíduos com sífilis primária e sífilis secundária as alterações no liquor podem ocorrer independentemente da co-infecção pelo VIH (Lukehart *et al.* 1988, Rolfs *et al.* 1997). Essas alterações nos co-infectados por VIH são de significado prognóstico desconhecido, porém, a maioria dos doentes responde à terapêutica correntemente utilizada (Rolfs *et al.* 1997). Por essa razão, o exame do liquor não é recomendado, por rotina, nos indivíduos infectados por VIH com sífilis recente.

Neste capítulo foram objectivos avaliar a eficácia de vários testes serológicos (incluindo os testes RPR e TP.PA, usualmente não recomendados para pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* no liquor), para o diagnóstico laboratorial de neurosífilis, através do estudo de amostras de liquor de doentes com suspeita de neurosífilis, utilizando como controlo negativo uma população de indivíduos sem sífilis, que efectuaram punção lombar devido a outras patologias.

2. Material e métodos

2.1. População

Neste estudo foram incluídos doentes provenientes das mesmas consultas e serviços hospitalares referidos no capítulo 2, os quais foram sujeitos a punção lombar para exclusão de diagnóstico de neurosífilis.

No total estudaram-se 188 indivíduos, 25 com sintomatologia para infecção por *T. pallidum*, e 163 assintomáticos para a mesma.

No grupo de indivíduos sintomáticos (25), quatro tinham diagnóstico de sífilis primária, oito de sífilis secundária, nove de neurosífilis, um de uveíte e três apresentavam alterações neuropsíquicas. Todos apresentavam co-infecção pelo VIH com excepção de dois, um com o diagnóstico de uveíte e o outro com o de

neurossífilis (meningo-encefalite).

No grupo dos assintomáticos, 103 tinham diagnóstico de sífilis latente e os restantes 60 tinham sido tratados para sífilis. Relativamente à infecção por VIH, 100 apresentavam co-infecção, em 57 não se obteve informação e seis não se encontravam infectados, por aqueles vírus.

No estudo, foi incluído um grupo de 46 amostras de liquor provenientes de indivíduos sem reactividade nos testes serológicos, que constituíram o grupo controlo negativo.

2.2. Exame citoquímico do liquor

A determinação da contagem diferencial de células e a concentração de proteínas do liquor foi facilitada pelos médicos assistentes dos respectivos doentes. A contaminação sanguínea do liquor foi verificada pela concentração de eritrócitos, que deveria ser inferior a 0,001%, de modo a evitarem-se resultados falsamente reactivos nos testes serológicos (Izzat *et al.* 1971, Davis e Sperry 1979, Larsen e Johnson 1998).

A pleiocitose definiu-se pela presença de mais de cinco células sanguíneas mononucleadas por mm³, e considerou-se aumento da concentração de proteínas, quando o seu doseamento foi superior a 45mg/dl (Gordon *et al.* 1994, Larsen e Johnson 1998).

2.3. Testes serológicos

Os liquores foram estudados pelos testes não treponémicos (VDRL e RPR) e testes treponémicos (FTA-Abs, TPHA, TP.PA e Western blot), já descritos no capítulo 2, com as modificações aí referidas, necessárias para o estudo de amostras de liquor e de acordo com os respectivos protocolos.

3.Resultados

Os resultados obtidos nas amostras de liquor dos indivíduos com suspeita de neurosífilis encontram-se na Tabela 37. Todos os liquores do designado grupo de controlo negativo (46) foram não reactivos com todos os testes serológicos.

O número de amostras reactivas nos diferentes testes serológicos dos indivíduos sintomáticos (25/188) foi a seguinte: 9/25 (36%) no VDRL, 10/25 (40%) no RPR, 11/25 (44%) no FTA-Abs e Western blot, 12/25 (48%) no TPHA, 13/25 (52%) no TP.PA. Em 13/25 (52%) observou-se pleiocitose e em 12/25 (48%) aumento da concentração de proteínas.

Tabela 37. Resultados obtidos com os testes serológicos e exame citoquímico nas amostras de liquor

	VDRL	RPR	FTA*	TPHA	TP.PA	WB*	Cél.	Prot.
	±vo/total	±vo/total	±vo/total	±vo/total	±vo/total	±vo/total	> /total	> /total
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Sintomáticos	9/25 (36%)	10/25 (40%)	11/25 (44%)	12/25 (48%)	13/25 (52%)	11/25 (44%)	13/25 (52%)	12/25 (48%)
Assintomáticos	12/163 (7,4%)	10/163 (6,1%)	31/163 (19%)	51/163 (31,3%)	40/127 (31,5%)	27/159 (17%)	26/163 (16%)	24/163 (14,7%)

* FTA – FTA-Abs, WB – Western blot

No grupo de indivíduos assintomáticos (163/188) obtiveram-se os seguintes resultados: 12/163 (7,4%) foram reactivos pelo teste VDRL, 10/163 (6,1%) pelo RPR, 31/163 (19%) pelo FTA-Abs, 51/163 (31,3%) pelo TPHA, tendo havido aumento de células mononucleadas em 26/163 (16%) e de concentração de proteínas em 24 (14,7%), tendo duas amostras resultados indeterminados com o teste FTA-Abs. Cento e vinte e sete e 159 destes liquores foram estudados, respectivamente, pelos testes TP.PA e Western blot, tendo 40/171 (31,5%) e 27/159 (17%) sido reactivos.

Grupo de indivíduos sintomáticos

Na comparação dos dois testes não treponémicos no estudo dos liquores (Tabela 38), os resultados foram coincidentes em 24 amostras, 15 não reactivas e nove reactivas por ambos os testes. Um dos resultados foi discrepante, correspondendo a uma amostra de um indivíduo sintomático para neurosífilis que, não tendo apresentado reactividade com o teste VDRL, a apresentou com o teste RPR, assim como, com os restantes testes treponémicos. O exame citoquímico desse liquor apresentava, também, aumento de células e da concentração de proteínas.

Tabela 38. Resultados obtidos com os testes VDRL e RPR nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo sintomático

		VDRL		Total
		Não reactivo	Reactivo	
RPR	Não reactivo	15	0	15
	Reactivo	1	9	10
Total		16	9	25

De acordo com o descrito nos materiais e métodos foi analisado o liquor de quatro doentes com sífilis primária, oito com sífilis secundária, nove com sintomas de neurosífilis, um com uveíte e três com alterações neuropsíquicas.

Nos doentes com sífilis primária (4), uveíte (1) e alterações neuropsíquicas (3) os resultados dos testes serológicos efectuados no liquor foram não reactivos.

Nos indivíduos com diagnóstico de sífilis secundária, tanto o RPR como o VDRL foram reactivos nas mesmas duas amostras de liquor, tendo sido não reactivos nas seis restantes. Nestas seis amostras, as proteínas e as células estavam aumentadas cada um destes parâmetros na sua amostra, uma tinha células e proteínas elevadas, duas apresentavam apenas reactividade no TPHA e TP.PA e

uma era totalmente negativa.

Sete das nove amostras de liquor de doentes com neurosífilis tiveram, simultaneamente, VDRL e RPR reactivos, assim como foram reactivas nos restantes parâmetros laboratoriais de infecção, exceptuando uma amostra com TPHA não reactivo. Nas restantes amostras, o VDRL foi não reactivo numa, noutra tanto o VDRL como o RPR foram não reactivos, sendo os resultados de todos os outros parâmetros reactivos.

Os resultados obtidos com os testes treponémicos e a sua inter-relação estão descritos na Tabela 39. Do total dos 25 indivíduos sintomáticos, a técnica FTA-Abs foi reactiva em 11 amostras de liquor, apresentando estas também o exame citoquímico alterado e testes serológicos reactivos, com excepção de três, um RPR negativo, um VDRL negativo e outro TPHA negativo.

Tabela 39. Resultados obtidos com os testes FTA-Abs, TPHA, TP.PA e Western blot, nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo sintomático

			FTA-Abs	
			Não reactivo	Reactivo
WB Não reactivo	TP.PA	TPHA	12	0
	Não reactivo	Não reactivo		
	TP.PA	TPHA	2	0
	Reactivo	Reactivo		
WB Reactivo	TP.PA	TPHA	0	1
	Reactivo	Não reactivo		
		TPHA	0	10
		Reactivo		

Todas as amostras reactivas com o teste TPHA (12/25) também o foram com o TP.PA. Destas, duas não apresentaram reactividade em nenhum dos restantes testes serológicos, enquanto que as outras 10 apresentaram reactividade em todos os outros, com excepção de duas amostras não reactivas, uma pelo teste RPR e outra em ambos os testes não treponémicos.

O TP.PA demonstrou reactividade em mais uma amostra que o TPHA, sendo de

referir que esta mesma amostra apresentava os restantes testes reactivos. Noutros dois liquores apenas o TPHA demonstrou reactividade simultaneamente.

Quando as amostras foram estudadas pela técnica de Western blot, a reactividade esteve presente em 11, coincidindo com a reactividade encontrada com o teste FTA-Abs.

Os resultados da pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* da classe das imunoglobulinas IgM, pelas técnicas de FTA-Abs-M e Western blot M, não revelaram reactividade com a primeira técnica e foi numa amostra reactiva com a segunda, num doente com o diagnóstico de neurosífilis.

Grupo de indivíduos assintomáticos

Os testes não treponémicos foram avaliados em 163 amostras de liquor do grupo de indivíduos assintomáticos.

A comparação dos resultados obtidos com estes testes encontra-se na Tabela 40. Cento e cinquenta e sete das amostras apresentaram resultados coincidentes (149 não reactivas e oito reactivas em ambos os testes), enquanto que quatro amostras reactivas pelo teste VDRL foram negativas pelo RPR. O contrário observou-se em duas amostras.

Tabela 40. Resultados obtidos com os testes VDRL e RPR nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo assintomático

		VDRL		Total
		Não reactivo	Reactivo	
RPR	Não reactivo	149	4	153
	Reactivo	2	8	10
Total		151	12	163

As oito amostras reactivas por ambos os testes não treponémicos apresentaram

reactividade nos testes FTA-Abs e TPHA e alteração no exame citoquímico, com exceção de duas, uma não reactiva por aqueles testes treponémicos e outra com células e proteínas dentro dos parâmetros da normalidade.

Quanto às duas amostras reactivas no teste RPR e negativas quando estudadas pelo teste VDRL, apresentaram reactividade nos testes treponémicos FTA-Abs e TPHA, e o resultado do estudo citoquímico estava alterado.

As amostras reactivas pelo teste VDRL e negativas no teste RPR foram em número de quatro, uma delas apresentou os restantes parâmetros normais e as três restantes reactividade nos testes FTA-Abs e TPHA, com o resultado do exame citoquímico alterado numa.

As 149 amostras com os dois testes não treponémicos não reactivos, foram sujeitas à avaliação, pela comparação dos resultados obtidos com os testes FTA-Abs, TPHA e exame citoquímico, os quais estão resumidos na Tabela 41.

Tabela 41. Discriminação dos resultados obtidos nos testes treponémicos e exame citoquímico das amostras de liquor nas quais os testes não treponémicos foram negativos

		FTA		
		Não reactivo	Reactivo	Indeterminado
Exame citoquímico	TPHA não reactivo	103	1	0
	TPHA reactivo	15	11	0
Exame citoquímico normal	TPHA não reactivo	6	0	0
	TPHA reactivo	4	8	1

Cento e três liquores apresentaram resultados negativos coincidentes em todos os parâmetros, enquanto 46 tinham resultados discordantes. Em relação a

estes (46), em 27 o resultado do exame citoquímico não estava alterado, se bem que em 11 os testes treponémicos tenham sido reactivos, em 15 apenas o foi o TPHA e num apenas o FTA-Abs. Nos restantes 19/46 liquores, o exame citoquímico encontrava-se alterado, estando este resultado associado aos dois testes treponémicos reactivos em oito, reactividade apenas no TPHA em cinco, um dos quais com o FTA-Abs indeterminado e em seis os testes serológicos foram negativos.

A avaliação dos testes treponémicos foi efectuada pela comparação com o teste FTA-Abs. Foram estudadas 127 amostras, cujos resultados estão esquematizados nas Tabela 42, 43 e 44

Na análise comparativa dos testes FTA-Abs e TPHA (Tabela 42) observou-se uma taxa de concordância de 89% (113/127).

Tabela 42. Resultados obtidos com os testes FTA-Abs e TPHA nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo assintomáticos

	FTA			Total
	Não reactivo	Reactivo	Indeterminado	
TPHA				
não reactivo	87	1	0	88
TPHA reactivo	11	26	2	39
Total	98	27	2	127

Em 14/127 (11%) das amostras estudadas, os resultados não foram concordantes, isto é uma amostra apenas apresentou reactividade no FTA-Abs, duas foram indeterminadas no mesmo teste e reactivas pelo TPHA e pelo TP.PA. Destas, apenas uma apresentava alterações no estudo citoquímico, sendo o Western blot reactivo, enquanto que a outra, embora com reactividade pelo teste VDRL, tinha os restantes parâmetros negativos.

Onze amostras foram reactivas pelo TPHA e negativas pelo FTA-Abs, tendo uma, os restantes parâmetros reactivos, em duas o exame citoquímico estava

alterado, destas uma com os outros testes negativos e a outra apenas o Western blot reactivo. Nas restantes 8/11 o exame citoquímico foi normal, e apenas seis apresentaram outras alterações, duas Western blot e TP.PA reactivos e quatro apenas reactividade no TP.PA

Na comparação dos testes FTA-Abs e TP.PA obteve-se a taxa de concordância de 88,2% (112/127), correspondendo a 86 amostras negativas e 26 reactivas por ambos os testes (Tabela 43).

Tabela 43. Resultados obtidos com os testes FTA-Abs e TP.PA nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo assintomáticos

	FTA G			
	Não reactivo	Reactivo	Indeterminado	
TP.PA não reactivo	86	1	0	87
TP.PA reactivo	12	26	2	40
Total	98	27	2	127

Os resultados foram discrepantes em 15 amostras. Duas com resultado indeterminado com o teste FTA-Abs e reactivas com TP.PA e uma reactiva no FTA-Abs e TP.PA negativa, foram descritas anteriormente. Em relação às restantes 12 (reactivas pelo teste TP.PA e negativas pelo FTA-Abs), quatro com exame citoquímico normal resultaram negativas em todos os outros testes, uma apresentava testes não treponémicos negativos e restantes parâmetros alterados, outra apenas com o Western blot negativo e seis com exame citoquímico normal, testes não treponémicos negativos e TPHA reactivo (em duas das quais o Western blot foi também reactivo).

A discriminação dos resultados obtidos pela comparação dos testes FTA-Abs e Western blot no grupo de indivíduos assintomáticos encontra-se na Tabela 44. A taxa de concordância entre os dois testes foi de 90,6% (115/127).

Tabela 44. Resultados obtidos com os testes FTA-Abs e Western blot nas amostras de liquor dos indivíduos do grupo assintomáticos

	FTA G			Total
	Não reactivo	Reactivo	Indeterminado	
WB não reactivo	95	7	1	103
WB reactivo	3	20	1	24
Total	98	27	2	127

Quanto aos resultados não coincidentes (12), três amostras eram reactivas pela técnica de Western blot e negativas pelo teste FTA-Abs, as quais quando estudadas pelos testes não treponémicos foram negativas, apresentando reactividade com os outros testes treponémicos, apenas uma tendo exame citoquímico alterado. Das sete amostras de liquor reactivos pelo teste FTA-Abs e negativos pela técnica de Western blot, uma apresentou todos os parâmetros alterados, outra foi negativa em todos, duas apenas com o resultado do exame citoquímico anormal e TPHA e TP.PA reactivos e três apenas com o TPHA e TP.PA reactivos. Em relação às duas amostras com resultado indeterminado pela técnica de FTA-Abs e já anteriormente referidas, uma foi reactiva e outra não reactiva pelo método de Western blot.

As 162 amostras em que foram pesquisados anticorpos de tipo IgM anti-*T. pallidum* foi efectuada pela técnica de FTA-Abs-M apresentaram resultados negativos. Com a técnica de Western blot M estudaram-se 158 amostras de liquor, obtendo-se reactividade apenas em três amostras que foram, também, reactivos nos outros testes treponémicos efectuados, no exame citoquímico e no teste RPR, exceptuando duas, apenas reactivas no teste VDRL.

4. Discussão e conclusões

Tal como anteriormente referido, o diagnóstico de neurosífilis não é fácil, quer do ponto de vista clínico, quer do ponto de vista laboratorial. Este torna-se mais simples nos doentes com sintomas clássicos desta infecção do sistema nervoso central ou naqueles que apresentam alterações do liquor consideradas indicadoras da doença, como um teste VDRL reactivo, aumento do número de células mononucleadas e da concentração de proteínas (Larsen *et al.* 1998, CDC 2002a).

O diagnóstico é mais complicado quando no mesmo indivíduo existe co-infecção *T. pallidum*-VIH, já que esta por si só pode dar origem a alterações do sistema nervoso central, semelhantes às associadas a *T. pallidum* (Appleman *et al.* 1988, Hollander 1988, Bolan 1998). Assim, torna-se difícil saber se as alterações no liquor estão relacionadas com a infecção viral ou com a infecção treponémica (Keir 1994, Marra *et al.* 1996). No estudo de Appleman *et al.* (1988) 30% dos indivíduos infectados por VIH e com serologia negativa para sífilis, apresentavam pleiocitose ou aumento de concentração de proteínas no liquor.

Nenhum teste ou combinação de testes aplicável ao estudo do liquor é suficientemente, sensível e específico para poder ser utilizado como padrão, permitindo a avaliação de novos testes, embora exista um grande número de testes laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da sífilis. Por exemplo, o teste de VDRL parece ser muito específico, mas pouco sensível (Izzat *et al.* 1971, Luger *et al.* 1981, Larsen *et al.* 1995), podendo ser não reactivo em cerca de 22 a 66% de amostras de liquor de doentes com neurosífilis em curso (Dans *et al.* 1986, Davis e Schmidt 1989, Keir 1994).

Por outro lado, as técnicas que, como o teste FTA-Abs, utilizam *T. pallidum* como antigénio parecem ser mais sensíveis do que o VDRL (Escobar *et al.* 1970, Garner e Bachouse 1971, Mahony *et al.* 1972, Young 1992). No entanto, o seu valor no estudo do liquor relaciona-se, sobretudo com a exclusão do diagnóstico, já que um teste FTA-Abs não reactivo parece excluir diagnóstico de neurosífilis (Luger 1981, García-Rodrigues *et al.* 1990, Hook e Marra 1992, Larsen *et al.* 1995, Swartz *et al.* 1999).

Na impossibilidade de se recorrer a um teste padrão, o diagnóstico de

neurossífilis fundamenta-se na associação de diferentes factores que combinam sinais e sintomas clínicos, resultados dos testes serológicos no liquor para diagnóstico de sífilis, e exame citoquímico com contagem de células mononucleadas e doseamento de proteínas (Hart 1986, Tramont 1995b, Larsen e Johnson 1998, CDC 2002a, Conde-Sendín *et al.* 2002).

No presente estudo, diferentes tipos de testes serológicos (não treponémicos e treponémicos) foram aplicados ao estudo do liquor com a finalidade de se avaliar a sua utilidade no diagnóstico de neurossífilis. A avaliação destes testes foi feita em indivíduos com e sem sintomatologia sífilítica e num grupo de indivíduos sem sífilis (grupo controlo), de modo a verificar as diferenças na alteração dos parâmetros de diagnóstico de neurossífilis entre os vários estádios.

Analisando os resultados obtidos no grupo controlo torna-se óbvio que quando os testes serológicos para pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* são não reactivos no sangue, são-no também no liquor, independentemente da infecção que os doentes possam ter, pelo que parece não existirem resultados de falsa reactividade no liquor de indivíduos sem sífilis. Este facto está de acordo com o recomendado por outros autores que preconizam que o estudo do liquor para exclusão de neurossífilis só deve ser efectuado quando os testes treponémicos no sangue são reactivos (Simon 1985, García-Rodrigues *et al.* 1990, Larsen *et al.* 1998), e de que as reacções de falsa reactividade são muitas vezes devidas, à passagem de anticorpos do sangue para o liquor ou da contaminação deste com aquele (Jaffé *et al.* 1978b, Marra *et al.* 1995.)

Ao comparar a globalidade dos resultados dos testes não treponémicos no grupo de indivíduos sintomáticos existiu coincidência em 24 amostras e discordância numa, reactiva com a técnica de RPR e nos testes treponémicos, e que apresentava alterações citoquímicas.

O resultado discrepante encontrado entre os dois testes parece indicar que o VDRL apresentou pelo menos um resultado falso negativo, uma vez que os restantes parâmetros utilizados para diagnóstico de neurossífilis mostravam alterações compatíveis com esse diagnóstico, pelo que o RPR confirmou o diagnóstico em mais um doente.

A análise do desempenho dos testes não treponémicos nos diferentes estádios

de sífilis, permitiu verificar que no liquor de doentes com sífilis primária, uveíte e alterações neuropsíquicas não existiram resultados falsamente reactivos, uma vez que em todos os doentes os resultados foram negativos. No estágio primário, os dois testes parecem, portanto, demonstrar boa especificidade. Na sífilis secundária os dois testes voltaram a ter resultados semelhantes, tendo confirmado o diagnóstico de todos os casos de neurosífilis, mesmo quando sem sintomatologia. Nesta fase, os indivíduos sem neurosífilis apresentaram os testes não treponémicos não reactivos, pelo que estes parecem oferecer boa sensibilidade e especificidade neste estágio da sífilis, apesar do pequeno número de indivíduos estudado. Por outro lado é importante referir que a sífilis secundária foi o estágio da doença em que se observaram mais vezes alterações de outros parâmetros utilizados no diagnóstico de neurosífilis (três amostras com aumento do número de células e/ou das proteínas e duas com alguns testes treponémicos dum total de seis doentes). Tal não é surpreendente, uma vez que é nesta fase que existe maior número de treponemas em circulação e em que estão descritas mais alterações do liquor (Lukerhart *et al.* 1988, Rolfs *et al.* 1997). Sendo assim, torna-se necessário maior cuidado na interpretação dos resultados do liquor em doentes com sífilis secundária.

Nos doentes com suspeita de neurosífilis sintomática, tanto o RPR como o VDRL não confirmaram um caso de neurosífilis, embora o RPR fosse reactivo num outro doente em que o VDRL foi negativo. Em parágrafos anteriores, foi referida a menor sensibilidade do teste VDRL em relação ao FTA-Abs em doentes com neurosífilis activa, nos quais, aquele pode ser não reactivo, em 22 a 66% das amostras de liquor (Hart 1986). No presente estudo e neste grupo de doentes a sua não reactividade foi observada em 22,2% (2/9) dos casos, enquanto que o RPR o foi em 11,1% (1/9). Assim, nos doentes com sinais de neurosífilis os dois testes não treponémicos apresentaram menor sensibilidade que os outros testes, embora a diferença fosse maior para o VDRL.

Que se saiba não existem publicados estudos de comparação entre o comportamento destes dois testes no liquor. No entanto, Larsen e Johnson (1998) recomendam que apenas o VDRL deve ser utilizado no liquor, o que tem sido a norma no diagnóstico de neurosífilis. Os resultados do presente estudo parecem indicar que o RPR, tal como o VDRL, pode ser utilizado para pesquisa

de anticorpos anti-*T. pallidum* no liquor, podendo aquele ser uma mais valia, uma vez que apresentou maior sensibilidade do que o VDRL, não se tendo observado resultados de falsa reactividade, permitindo confirmar o diagnóstico de maior número de casos de neurosífilis.

Em relação aos testes treponémicos, no grupo de indivíduos sintomáticos o FTA-Abs parece ser mais sensível que o TPHA e mesmo do que o VDRL e do que o RPR, uma vez que todos os doentes com reactividade naquele teste (11/25) tinham também alterações noutros parâmetros e melhoraram após se ter instituído terapêutica com penicilina. De notar que um doente cujo liquor foi não reactivo pelo TPHA era sintomático para neurosífilis.

Nas 12 amostras em que o TPHA foi reactivo, o resultado de 10 (coincidentes com o FTA-Abs) foi discutido no parágrafo anterior, parecendo as duas restantes correspondem a resultados falsos positivos dos testes TPHA e TP.PA, pelo que, para além do TPHA diagnosticar menos casos de neurosífilis, parece também, apresentar maior número de resultados falsamente reactivos. De notar que os dois casos referidos correspondem a doentes com sífilis secundária, cujos títulos de anticorpos no sangue eram muito elevados (1:20480) contrariamente aos do liquor em que os títulos eram baixos (1:8 e 1:32), e em que o estudo citoquímico foi normal. Como foi salientado anteriormente, neste estágio (Tramont 1995a) há grande circulação de anticorpos anti-*T. pallidum* no sangue e a contaminação do liquor, durante a punção lombar (Izzat *et al.* 1971, Hart 1986, Wicher *et al.* 1999), pode levar a resultados falsamente reactivos. Esta situação pode ter acontecido, se bem que se tenham eliminado todas as amostras que mostravam contaminação observável macroscopicamente e com concentração de eritrócitos superior a 0,001%.

O TP.PA parece ser semelhante ao TPHA uma vez que os dois testes apresentaram dois resultados de falsa reactividade coincidentes, tendo sido obtido mais um resultado falso com a técnica de TPHA. Não existem referências, nem outros trabalhos, em que o teste TP.PA tenha sido utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* no liquor. No entanto, parece que, pelo menos, nos doentes sintomáticos e em relação à sensibilidade os resultados obtidos estão mais próximos do FTA-Abs, teste considerado mais sensível para pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* no liquor (Birry e Kasatiya 1979,

Maclean e Luger 1996).

Ainda no grupo de doentes sintomáticos o Western blot parece ter o mesmo desempenho que o teste de FTA-Abs, pelo que, as recomendações de utilização deverão ser as mesmas para ambos os testes (Dettori *et al.* 1989, Pâris-Hamelin *et al.* 1999).

Vários autores têm referido a importância da pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* da classe das imunoglobulinas IgM pelas técnicas de FTA-Abs e Western blot no diagnóstico de neurosífilis, tendo concluído que a sua reactividade poderia ajudar no diagnóstico de neurosífilis activa (Gschnait *et al.* 1981, Luger *et al.* 1981). Luger *et al.* (1981) demonstraram reactividade para anticorpos IgM por técnica de cromatografia no soro e liquor de todos os doentes com neurosífilis activa, excepto para um liquor de um doente inadequadamente tratado para sífilis, sugerindo os autores que as doses subcurativas de penicilina teriam negativado a reactividade para aqueles anticorpos. A mesma pesquisa utilizando a técnica de imunofluorescência indirecta detectou apenas três de 11 casos de neurosífilis.

Neste estudo, e embora se tivesse utilizado, também, uma técnica de imunofluorescência indirecta e uma de Western blot, as mesmas não demonstraram ser de utilidade, uma vez que apenas uma em nove das amostras de doentes com neurosífilis sintomática demonstrou reactividade pela técnica de Western blot.

No grupo dos indivíduos assintomáticos para infecção a *T. pallidum*, avaliado neste estudo, parece haver uma maior dificuldade em confirmar o diagnóstico de neurosífilis através da pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* no liquor.

Em relação aos testes não treponémicos, dos oito casos reactivos em ambos os testes, apenas um não apresentava exame citológico alterado e noutro, apenas o FTA-Abs e TPHA eram não reactivos. Nestas amostras a diluição do teste não treponémico foi apenas de um dil. A dificuldade na interpretação destes resultados existiu essencialmente na segunda amostra, pois tendo os testes específicos normais e apenas VDRL e RPR reactivos, as alterações do exame citológico poderiam ser devidas a outras alterações concomitantes, nomeadamente a infecção pelo vírus VIH, presente neste doente. Este indivíduo fez terapêutica específica não tendo havido modificações das alterações do

exame citoquímico, o que parece confirmar a hipótese do doente não ter neurosífilis. O primeiro indivíduo, apesar de não ter alterações no exame citoquímico, foi considerado como provável neurosífilis, visto estar presente um teste de VDRL reactivo no liquor qual é considerado como critério de diagnóstico de neurosífilis, além de apresentar também reactividade nos testes treponémicos (Larsen *et al.* 1998, Conde-Sendiu *et al.* 2002). Assim, o teste RPR parece ser mais útil do que o VDRL para o diagnóstico de neurosífilis, uma vez que duas amostras reactivas no primeiro teste e negativas no segundo, foram verdadeiros positivos, sendo de doentes com neurosífilis. Pelo contrário, das quatro amostras reactivas no VDRL, negativas no RPR, três eram de doentes já tratados e uma, apenas, com exame citológico anormal, de um doente com infecção por VIH, tendo as alterações citológicas regredido após a terapêutica.

Quando se compara os testes não treponémicos com os testes treponémicos, nos indivíduos do grupo assintomático, estes parecem ser mais sensíveis, uma vez que nove amostras de liquor com VDRL e RPR não reactivos, apresentaram exame citoquímico alterado e reactividade nos testes treponémicos, melhorando após a terapêutica. Tal está de acordo com vários estudos que consideram útil associar a pesquisa de anticorpos específicos quando do estudo de doentes com suspeita de neurosífilis (Al-Semari *et al.* 2001, Conde-Sandín *et al.* 2002, Marra *et al.* 2004). No entanto, existiram 11 casos em que o TPHA e FTA-Abs foram reactivos, mas tanto o estudo citoquímico, como os testes não treponémicos não apresentaram alterações. Em sete destes o Western blot foi reactivo, como não existiu monitorização do resultado da terapêutica, torna-se impossível analisar o significado destes resultados e concluir da existência de neurosífilis nestes doentes.


Quando se comparam os testes treponémicos entre si, a taxa de concordância dos testes mais utilizados no diagnóstico de sífilis, o FTA-Abs e o TPHA, foi de 89%. Analisando estes resultados verificou-se que nos 14 casos em que o FTA-Abs e o TPHA não eram concordantes, um correspondeu a um resultado falso positivo do teste FTA-Abs e seis a resultados falso positivos do teste TPHA. Em relação às duas amostras indeterminadas pelo teste FTA-Abs é difícil extrair conclusões, uma vez que numa existiam alterações citoquímicas e os restantes testes treponémicos eram reactivos, embora os testes não treponémicos fossem

negativos, e na outra apenas o TP.PA e o VDRL foram positivos. O mesmo se aplica às duas amostras com teste de FTA-Abs negativo, teste TPHA reactivo e com exame citoquímico alterado, atendendo a que não foi efectuada segunda colheita para controlo.

Estas são as situações em que a conjugação dos sinais e sintomas clínicos, em conjunto com a prova terapêutica são necessários para um diagnóstico correcto, tal como referido por MacLean e Luger (1996) e Luger *et al.* (2000). Assim, e de acordo com os resultados apresentados, o teste FTA-Abs parece ser mais específico do que o TPHA, para o diagnóstico de neurosífilis.

Na comparação do TP.PA, com o FTA-Abs, a taxa de concordância (88,2%) foi um pouco menor do que a obtida com o TPHA, parecendo apresentar maior número de reacções falso positivas que o FTA-Abs, sendo portanto menos específico.

A avaliação da técnica de Western blot foi também feita em relação com o teste FTA-Abs, tendo os dois concordado em 91%, taxa ligeiramente maior que para os dois testes anteriormente estudados. Tendo em conta os resultados em que se obteve um diagnóstico de certeza e a taxa de concordância entre os dois testes, o Western blot parece ser o teste treponémico que mais se assemelha ao FTA-Abs. Assim aquele teste parece ser bastante específico para o diagnóstico de sífilis no liquor, tal como referido para o soro (Dettori *et al.* 1989, Byern *et al.* 1992, Meyer *et al.* 1994, Larsen *et al.* 1995, Pâris-Hamelin *et al.* 1999, Sambri *et al.* 2001b), embora sejam necessários mais estudos para comprovar esta afirmação.



Capítulo 4. Pesquisa de ADN de *Treponema pallidum*

1. Introdução

Não sendo cultivável em meios artificiais, o isolamento e a identificação de *T. pallidum* tornam-se complicados, continuando a colocar problemas no diagnóstico laboratorial da sífilis.

Os métodos microscópicos são relativamente insensíveis (microscopia de fundo escuro aproximadamente 10^5 microrganismos/ml - Tramont 1995a) e apenas podem ser aplicados quando existem lesões. O isolamento de *T. pallidum* conseguido por inoculação em animal (teste de infecciosidade no coelho), é considerado o método mais sensível de detecção de *T. pallidum*, bastando a presença de 10 microrganismos viáveis para resultar na seroconversão no coelho. No entanto, porque é uma técnica muito cara, necessitando da existência de um biotério e porque o período de incubação no coelho é prolongado, sobretudo quando existe um pequeno número de treponemas no inóculo, o método raramente é utilizado com propósitos de diagnóstico. Por estas razões, os testes serológicos têm-se mantido como o melhor método para o diagnóstico da infecção por *T. pallidum*. Contudo, estas técnicas não permitem a confirmação do diagnóstico, essencialmente em certos estádios da infecção, durante os quais apresentam pouca sensibilidade e/ou especificidade como no estágio primário, na sífilis congénita e na neurosífilis (Srinivasan 1983, Hart 1986, Jordan 1988, Tratmont 1990).

Nos últimos anos, o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, como a técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR), permitindo uma pesquisa específica e sensível (Saiki *et al.* 1988) de ADN bacteriano, abriu uma série de novas perspectivas no diagnóstico laboratorial de agentes infecciosos de difícil cultura como *Mycobacterium leprae* (Woods e Cole 1989), o vírus do papiloma humano (Snijlers *et al.* 1990), *Borrelia burgdorferi* (Nielsen *et al.* 1990, Rosa e Schwan 1989), assim como *T. pallidum* subespécie *pallidum* (Hay *et al.* 1990a, Noordhoek *et al.* 1990, Burstain *et al.* 1991).

Como atrás referido, o principal fundamento da técnica da PCR consiste na síntese de um fragmento específico de ADN através de ciclos sucessivos de repetição, resultando na multiplicação exponencial do mesmo, até que quantidade suficiente do produto amplificado se acumule, podendo ser então detectado. Deste modo, uma única molécula de ADN pode gerar cerca de um bilião de cópias após 30 ciclos de replicação exponencial, apresentando este ensaio, alta sensibilidade e permitindo detectar, pelo menos teoricamente, até ao mínimo de um microrganismo.

As técnicas de PCR para pesquisa de ADN de *T. pallidum*, desenvolvidas por diferentes investigadores (Burstain *et al.* 1991, Noordhoek *et al.* 1991, Jethwa *et al.* 1995, Centurion-Lara *et al.* 1997) têm como alvo de amplificação sequências de genes de lipoproteínas de membrana, por serem genes geneticamente conservados. Burstain *et al.* (1991) e Jethwa *et al.* (1995) desenvolveram uma técnica de PCR que amplifica um fragmento de 658 pb do gene da lipoproteína de membrana de 47kDa. Os primeiros aplicaram a técnica em amostras de liquor, de soro e de líquido amniótico. No entanto, tratou-se de um estudo limitado, não permitindo tirar conclusões. Jetwa *et al.* (1995) compararam a técnica de PCR com uma técnica de imunofluorescência directa, tendo obtido a taxa de concordância de 95,5% e concluído que as técnicas eram semelhantes em termos de discriminação de agente etiológico. Na sequência destes trabalhos iniciais surgiram outros, quer do tipo de estudos experimentais utilizando estirpe de Nichols de *T. pallidum* (Wicher *et al.* 1992, Wicher *et al.* 1998), quer para o diagnóstico laboratorial de úlceras genitais utilizando amostras de exsudado das mesmas (Orle *et al.* 1996, Morse *et al.* 1997, Mertz *et al.* 1998, Liu *et al.* 2001, Bruisten *et al.* 2001) ou de liquor para o diagnóstico de neurosífilis (Marra *et al.* 1996, Centurion-Lara *et al.* 1997).

Assim, o estudo de métodos de biologia molecular neste trabalho teve como objectivo avaliar a eficiência da técnica de PCR no diagnóstico laboratorial da infecção por *T. pallidum* em vários períodos da infecção e em diferentes tipos de amostras clínicas. Com essa finalidade, foi montada e optimizada uma técnica de PCR, que passará a ser designada como PCR-diagnóstica, baseado nos ensaios e nos resultados descritos por Orle *et al.* (1996) e Liu *et al.* (2001).

Orle *et al.* (1996) desenvolveram um método de PCR para o diagnóstico

diferencial de úlceras genitais, que inclui a pesquisa simultânea de ADN dos três agentes mais comuns de úlcera genital: *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum* e o vírus Herpes simplex, utilizando na mesma reacção três pares de sequências iniciadoras, uma para cada um dos referidos microrganismos (PCR multiplex). Para *T. pallidum* foram utilizadas sequências iniciadoras tendo como alvo de amplificação o gene da lipoproteína de 47 kDa (Hsu 1989). Numa primeira fase era efectuada a amplificação, sendo em seguida os produtos detectados e identificados pela utilização de oligonucleótidos individuais (sondas), específicos para cada um dos microrganismos em causa. Os autores demonstraram tratar-se de uma técnica sensível e específica, permitindo o diagnóstico diferencial entre os referidos agentes etiológicos de úlcera genital e tendo estabelecido a presença de um agente etiológico em 80% das amostras estudadas. Relativamente à pesquisa de ADN de *T. pallidum*, a técnica de PCR multiplex foi negativa em sete amostras, positivas na microscopia de fundo escuro, tendo sido detectado ADN de *T. pallidum* em 15 amostras negativas na técnica microscópica. Morse *et al.* (1997), utilizando esta mesma técnica encontraram uma percentagem de 26% de úlceras genitais positivas para ADN de *T. pallidum*, nos 105 doentes estudados. Contudo, não determinaram a sua sensibilidade e especificidade, por não ter sido possível utilizar outro método de diagnóstico que não os testes serológicos, os quais são relativamente insensíveis e inespecíficos em determinados estádios da infecção. Por outro lado, Behets *et al.* (1999), ao utilizarem este tipo de técnica de PCR em amostras de doentes com úlceras genitais e comparando a serologia para sífilis com esta, encontraram sensibilidade de 72% e especificidade de 83%, enquanto que na comparação do diagnóstico clínico com a PCR aquelas percentagens foram de 93% e 20%, respectivamente.

Por outro lado, Liu *et al.* (2001) descreveram uma técnica de PCR para o diagnóstico de infecção a *T. pallidum*, na qual utilizaram sequências iniciadoras para amplificar um fragmento do gene da enzima, ADN polimerase I (Rodes 2000). Os autores testaram a técnica com um painel de outros microrganismos e estudaram amostras clínicas provenientes de úlceras genitais. Nesta experiência obtiveram especificidade de 95,7% e sensibilidade de 95,8%, na comparação com a técnica de PCR multiplex. Embora estes autores tenham

executado a técnica apenas no estudo de amostras de úlceras genitais, a mesma foi aplicada noutros estudos, não só para a pesquisa de ADN de *T. pallidum* de amostras de úlceras genitais como em amostras de sangue (Marfin *et al.* 2001, Sutton *et al.* 2001, Orton *et al.* 2002). Marfin *et al.* (2001) efectuaram a pesquisa de ADN de *T. pallidum* amplificando um fragmento do gene da ADN polimerase I para o estudo de amostras de sangue de 32 indivíduos. Destes, oito supostamente em período de incubação para sífilis, sete com sífilis primária, um com sífilis secundária, 12 com sífilis latente e quatro com úlcera genital de outras etiologias, tendo obtido a percentagem de positividade de 40% (13/32).

Os problemas no diagnóstico laboratorial de sífilis dificultam, também, a compreensão da sua epidemiologia.

Os estudos epidemiológicos da sífilis são, em geral, baseados em testes serológicos, após o diagnóstico do caso índice, sendo os contactos notificados e tratados. Apesar de estas acções serem uma boa metodologia para prevenção e controlo, não dão informações sobre o agente etiológico. Porém, sabe-se, que em estudos epidemiológicos as informações sobre o agente são importantes para se conhecer a estirpe prevalente numa dada região geográfica, a sua prevalência nas áreas endémicas e não endémicas, e no caso de epidemias, qual a estirpe que originou um surto epidémico. Por outro lado, a identificação da estirpe pode ajudar na diferenciação entre reinfecção e recidiva e na determinação da possibilidade de relação entre determinado genótipo e a progressão da infecção para os estádios tardios.

Pillay *et al.* (1998) desenvolveram um sistema de tipagem molecular para *T. pallidum*, com o objectivo de esclarecer algumas destas questões. Os sistemas de tipagem anteriormente utilizados não apresentaram resultados, por não permitirem diferenciar *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* dos outros treponemas patogénicos para o homem (Centurion-Lara 1996), visto estudarem genes conservados. Pillay *et al.* (1998), baseados em estudos efectuados para outras bactérias (O'Rourke *et al.* 1995, Andersen *et al.* 1996), escolheram genes com uma maior probabilidade de possuírem variações ou apresentarem heterogeneidade entre estirpes, como os genes com sequências repetidas ou

família multigénicas.

O genoma de *T. pallidum* possui uma família multigénica *tpr* – “multigene *Treponema pallidum* repeat” (Stamm *et al.* 1998, Fraser *et al.* 1998), constituída por 12 genes designados pelas letras de A a L, e um gene com uma sequência repetida de 60 pares de bases (pb) da proteína acídica com repetições, o gene *arp* “acidic repeat protein” (Fraser *et al.* 1998, Liu *et al.* 2001). Estes foram os genes alvos escolhidos por Pillay *et al.* (1998) para o desenvolvimento de um sistema de tipagem molecular a aplicar a *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, por apresentarem heterogeneidade e assim se poderem discriminar os subtipos. Segundo o estudo de Pillay *et al.* (1998), o método mostrou-se discriminatório, diferenciando claramente as estirpes não relacionadas, sendo, também, reprodutível.

Para determinar o número de repetições do elemento repetitivo de 60 pares de bases no gene *arp*, efectua-se a amplificação do fragmento que o contém, seguida de visualização por electroforese dos produtos e análise dos mesmos, em sequenciador automático ABI 310 – ByoSystem, com “software GeneScan 672, de modo a determinar o número de repetições.

Para o gene *tpr* o método de estudo consiste numa primeira amplificação de um fragmento do gene, seguido de uma segunda amplificação de um fragmento interno ao primeiro (“nested-PCR”). O produto final é, em seguida, submetido à técnica de RFLP “Restriction Fragment Length Polymorphisms” com a utilização da enzima de restrição *MseI*. A utilização das enzimas de restrição permite detectar variações nas sequências do ADN genómico, pela análise dos polimorfismos nos perfis electroforéticos dos fragmentos resultantes. A maioria destas enzimas reconhece sequências específicas de ADN e hidrolizam a molécula de ácido nucleico no local de reconhecimento ou na sua vizinhança. A presença de alterações nas sequências impeditiva da acção da enzima, resulta na alteração do padrão de fragmentos esperados, quando da sua visualização por electroforese. Para a determinação com melhor acuidade da dimensão dos fragmentos a leitura pode ser efectuada no sequenciador automático de ADN.

O padrão de RFLP, com *MseI* para o gene *tpr* combinado com o número de repetições de 60 pb do gene *arp*, permitiu o desenvolvimento do esquema de genotipagem. Assim, o genótipo é designado pelo número de sequências

repetidas do gene *arp* seguido de uma letra minúscula (a, b, etc.) correspondente ao padrão de RFLP do gene *tpr* correspondente. Por exemplo, o gene da estirpe de Nichols de *T. pallidum* apresenta um produto de amplificação de 1155 pb correspondente a 14 sequências de repetição, sendo por isso referido como subtipo 14. A este número é em seguida associada uma letra (a, b, c, d, etc.) correspondente ao padrão obtido pela utilização da técnica de RFLP, após tratamento com a enzima *MseI* dos produtos amplificados por PCR de um fragmento do gene *tpr*. Assim, na estirpe de Nichols, o padrão de RFLP obtido com o estudo do gene *tpr* foi designado pela letra a, pelo que o subtipo da estirpe de Nichols se designa subtipo 14a.

Pillay *et al.* (1998), no estudo de amostras de úlceras genitais obtidas de doentes com sífilis de Madagáscar, Estados Unidos e África do Sul determinou 12 subtipos *arp* designados como 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19 e 20, de acordo com o número de repetições, enquanto que em relação ao gene *tpr* diferenciou sete subtipos, designados pelas letras de a a g. Combinando os dois sistemas discriminou um total de 16 genótipos (10 b e d, 11d, 12 a e g, 13d, 14 a-f, 15d, 16 d-f, 20b). A estirpe mais prevalente na população estudada correspondeu ao subtipo 14d.

Posteriormente, o método foi utilizado noutros estudos (Sutton *et al.* 2001, Pillay *et al.* 2002), tendo os autores conseguido não só subtipar ADN de *T. pallidum* de amostras de exsudados de úlceras, mas também de algumas amostras de sangue, embora em pequeno número. No estudo efectuado por Sutton *et al.* (2001), em doentes com sífilis dos Estados Unidos (Região de Arizona), o subtipo mais prevalente foi o 14f (53% das amostras tipadas), e para além da detecção de outros subtipos já conhecidos, nomeadamente 12a, 14a, 14d, foram identificadas novos subtipos designados 4f, 4i, 4m, 5f, 12f, 14e e 14i.

Com base nestes trabalhos precedeu-se à montagem da técnica de PCR-diagnóstica e de tipagem molecular no laboratório de DST do IHMT, iniciando a sua optimização relativamente às condições existentes. Em primeiro lugar, efectuou-se a pesquisa do ADN de *T. pallidum* com sequências iniciadoras para dois genes codificadores um da lipoproteína de 47 kDa e outro da ADN polimerase I, inicialmente em reacções de PCR separadas e, posteriormente, na

mesma mistura de reacção. Após estabelecidas as melhores condições de amplificação, realizou-se o estudo de diferentes tipos de amostras provenientes de doentes em vários estádios da infecção, já que seria particularmente útil o desenvolvimento de uma técnica de biologia molecular que pudesse ser utilizada no estudo dos casos de mais difícil diagnóstico laboratorial, como sejam a sífilis latente e a neurosífilis. Algumas das amostras positivas pela técnica de PCR-diagnóstica, foram em seguida genotipadas utilizando-se para tal o sistema desenvolvido por Pillay *et al.* (1998) atrás descrito.

Com este trabalho pretendeu-se:

1. Desenvolver e otimizar uma técnica de PCR sensível e específica para o diagnóstico de infecção a *T. pallidum*, através da
 - a. Definição do tipo de amostra adequada a esta técnica
 - b. Confirmação da presença de *T. pallidum* em circulação na fase de sífilis latente
 - c. Verificação da utilidade desta técnica no diagnóstico de neurosífilis
2. Implementar e determinar a especificidade da técnica de genotipagem
3. Conhecer os subtipos de *T. pallidum* provenientes de algumas amostras de doentes envolvidos neste estudo.

2. Material e métodos

2.1. População

Neste estudo foram incluídas amostras de material colhido em doentes dos mesmos serviços hospitalares e consultas referidos no capítulo de pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum*. Para a pesquisa de anticorpos os procedimentos foram idênticos aos descritos no capítulo 2, com excepção das colheitas para pesquisa de ADN, que teve um procedimento diferente. Para a pesquisa de ADN colheu-se sangue periférico total para tubo com EDTA, e quando possível procedeu-se à colheita do exsudado de escarificação do lóbulo da orelha (de modo semelhante à colheita para pesquisa de *Mycobacterium leprae*), colocando-o em tubo com meio de transporte (PBS estéril). A colheita de liquor foi feita sempre que se suspeitava de neurosífilis ou para exclusão deste diagnóstico. Na presença de úlcera genital e/ou lesões de secundarismo foi efectuada colheita de exsudado para o mesmo meio de transporte. As amostras colhidas foram mantidas a 4° C até envio para o laboratório de DST do IHMT.

No laboratório, aproximadamente 500 µl de sangue total com EDTA foi centrifugado para obtenção de plasma sendo aliquoteado e congelado a – 80° C. Os exsudados das lesões e das escarificações do lóbulo da orelha foram aliquoteados e armazenados a – 80° C, sendo utilizado o mesmo procedimento para as amostras de liquor.

Pela técnica de PCR-diagnóstica foram estudados amostras de 176 doentes. Em 128/176 doentes analisaram-se três tipos de amostras: sangue total, plasma e soro. Em 49 destes também se colheu amostra de exsudado de lóbulo de orelha. Em 48/176 doentes apenas foi possível estudar amostras de soro, com excepção de três em que se obtiveram também amostras de exsudados de lóbulo de orelha. Estudaram-se 161 amostras de liquor, pertencendo 124 delas aos doentes acima mencionados.

Oito exsudados de úlceras genitais, dez de lesões cutâneas e dois de lesões mucosas, provenientes de 13 doentes, foram, também, avaliados. A um dos doentes com úlcera genital foram também colhidas duas amostras de lesões

cutâneas com localização diferente. As duas amostras de lesões mucosas e outras duas de lesões cutâneas foram colhidas de locais diferentes do mesmo indivíduo. Dois exsudados de lesões cutâneas de localização diferente foram colhidos de dois doentes, enquanto que dos nove doentes restantes apenas se recebeu uma única amostra de lesão cutânea em dois ou de úlcera em sete.

Das amostras que resultaram positivas pela técnica PCR-diagnóstica, foram estudadas quatro amostras de úlceras, seis de lesões de secundarismo (duas de cada doente), 26 de sangue total, plasma e soro, 22 de exsudado de escarificação do lóbulo da orelha, e 13 de liquor, pela técnica de subtipagem, com o objectivo de determinar o subtipo de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*.

2.2. Amplificação de ADN de *Treponema pallidum* (PCR – diagnóstica)

Extracção de ADN total

Em todas as amostras estudadas pela técnica da PCR, o ADN cromossómico foi isolado utilizando-se o kit comercial Mini-Kit –QIAamp Blood Qiagen Blood/Tissue Kit – Qiagen.

A extracção efectuou-se a partir de 200 µl de amostra descongelado à temperatura ambiente.

As amostras foram pipetadas para tubos estéreis de microcentrífuga de 1,5 ml, onde se tinham previamente colocado 20 µl (40 µl no caso de sangue total) de proteinase K, colocando-se em seguida 200 µl de tampão AL. Os conteúdos dos tubos foram então misturados no vortex durante cerca de três a cinco segundos e incubados a 56°C em banho seco, durante 20 minutos (duas horas para o sangue total). Em seguida deixou-se arrefecer e centrifugou-se para remoção das gotas de condensação no interior do tubo, de modo a prevenir contaminação cruzada do ADN.

Após cuidadosa abertura dos tubos, com excepção das amostras de sangue, adicionara m-se 3 µl de ADN de timo de vitela (10.5 µg/µl, Sigma) diluído a 1:10, e de seguida 200 µl de etanol (96-100%) misturando-se no vortex durante

15 segundos. As misturas permaneceram em repouso durante cinco minutos à temperatura ambiente.

As colunas QIAamp fornecidas foram então colocadas em tubos colectores de 2 ml, as misturas foram colocadas na coluna, sem molhar os bordos da mesma. Os tubos com as colunas foram centrifugados a 8.000 rpm durante 1 minuto, colocando-se estas em novos tubos colectores e rejeitando os anteriores com o filtrado. Após cuidadosa abertura das colunas adicionaram-se 500 µl de tampão AW1, e centrifugou-se de novo a 8000 rpm durante um minuto. Repetiu-se esta operação de lavagem mais duas vezes no caso das amostras de sangue.

Seguiu-se uma segunda lavagem das colunas com 500 µl de tampão AW2 e centrifugação a 14000 rpm durante três minutos, mudando-se sempre o tubo colector. Esta lavagem foi também repetida três vezes para as amostras de sangue. Em seguida, e de modo a assegurar a eliminação total do tampão AW2, efectuou-se uma nova centrifugação das colunas a 12000 rpm durante um minuto.

Antes de efectuar a eluição, e com auxílio de uma ponta de pipeta, foram retirados quaisquer resíduos de tampão AW2 que tivessem permanecido no interior da coluna.

Para eluição as colunas foram colocadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml e adicionados 80 µl (50 µl para a extracção a partir do sangue total) de tampão de eluição. Após cinco minutos à temperatura ambiente as colunas foram centrifugadas a 14000 rpm durante um minuto e a solução de ADN eluída foi dividida em alíquotas e guardadas a -20° C até utilização posterior.

O mesmo protocolo foi utilizado na extracção de ADN a partir de 200 µl de extracto testicular (5×10^3 treponemas/µl) de coelho infectado com *T. pallidum*. Esta ADN foi utilizado como controlo positivo e a sua preparação nunca decorreu em paralelo com a das amostras.

PCR-diagnóstica

Usaram-se os termocicladores DNA-Amplifer MIR-D30 (Sanyo) e PCR Express (HYBAID).

Diferentes sequências iniciadoras foram ensaiadas e para cada uma delas testaram-se várias concentrações dos reagentes da mistura de PCR, diferentes

enzimas e condições físicas da PCR, nomeadamente temperatura e tempos para cada um dos diferentes passos dos ciclos da PCR.

As sequências anteriormente usadas por Orle *et al.* (1996) e Liu *et al.* (2001) e também novas sequências iniciadoras desenhadas no âmbito deste estudo no programa Primer-Express a partir da sequência dos respectivos genes (Tabela 45), foram testadas, tentando obter sequências mais específicas do que as descritas anteriormente. Inicialmente, cada uma das sequências iniciadoras foi experimentada isoladamente e após estabelecimento das condições de amplificação mais adequadas, experimentou-se a utilização de dois pares daquelas (um para cada gene alvo) numa mistura de reacção única.

Tabela 45. Sequências de oligonucleótidos para a PCR – Diagnóstica

Sequências iniciadoras	Oligonucleótidos	Dimensão do produto PCR amplificado	Gene alvo
K03A ¹ -F	5'-AAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT-3'	260 pb	Liporoteína 47 kDa
K04 ¹ -R	5'-AGAGCCATCAGCCCTTTTCA-3'		
47-F ³	5'-ACGGCCTTAAGACAATGCTCA-3'	301 pb	
47-R ³	5'-TTCCACCAGGAGTCAGCAGAG-3		
<i>polA</i> -F ²	5'-TGCGCGTGTGCGAATGGGTGGTC-3'	378 pb	ADN polimerase I
<i>polA</i> -R ²	5'-CACAGTGCTCAAAAACGCGTGCACG-3		
<i>polA</i> -F (PE) ³	5'-ACCGGAGGTGAACTCCGTATT-3'	460 pb	
<i>polA</i> -R (PE) ³	5'-AGACGTCGAAGCTGGTGCAT -3'		

1. Descrito em Orler *et al.* (1996)

2. Descrito em Liu *et al.* (2001)

3. Desenhados no programa "Primer-express"

F – sequência a montante da região a estudar

R – sequência a jusante da região a estudar

Misturas de reacção para PCR

Para cada reacção de amplificação preparou-se, num volume total de 20 µl, uma solução em água ultra pura de Tampão PCR1x (tampão fornecido com a enzima utilizada), cloreto de magnésio (MgCl₂) na concentração variável de 3,5 a 2 mM, 1mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dCGT, dTTP – Amersham Pharmacia Biotech), 100, 50 ou 25 pmol de cada um dos pares de sequências iniciadoras e 2 U da enzima ADN polimerase. Recorreu-se a duas enzimas termoestáveis: a ADN polimerase “Taq” (*Thermus aquaticus* - Fermentas) e a ADN polimerase – Immolase (Bioline).

A mistura de reacção foi preparada e distribuída por tubos de PCR estéreis de 0,5 ml. As amostras de ADN a amplificar ou correspondente controlo negativo foram adicionadas numa área fisicamente distinta da utilizada na preparação da mistura de reacção. Aquando da utilização do termociclador “DNA-Amplifer MIR-D30” (Sanyo) adicionaram-se 20 µl de óleo mineral estéril (Sigma), a fim de evitar a evaporação da amostra.

Os termocicladores usados foram programados segundo o tipo de enzima e as sequências iniciadoras utilizadas tendo-se variado tempos e temperaturas das diferentes fases da amplificação de modo a determinar as condições mais adequadas da mesma. Após uma desnaturação inicial de quatro minutos a 94°C quando presente a enzima Taq-ADN polimerase e de cinco minutos a 95°C para a enzima Immolase, seguiram-se os ciclos de amplificação. Foram testados um total de 30 e 45 ciclos de amplificação, os quais consistiram em desnaturação a 94°C durante 20/30 segundos, ligação das sequências iniciadoras com a sequência alvo entre 55°C e 62°C, durante 30 a 40 segundos, seguidos de uma extensão a 72°C durante 30 a 40 segundos, com uma extensão final a 72°C durante cinco a 15 minutos, consoante o gene alvo.

Visualização do ADN

As amostras do ADN amplificado foram visualizadas após electroforese em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio. O gel com 1,5 g de agarose (Biorad 162-0100) dissolvida em 100 ml de tampão TBE 1x efectuado a partir de

tampão TBE 10X (Tris-base 108 g, ácido bórico 55 g, EDTA 0,6M 9,36 g em 100 ml de água) foi preparado. Após fusão da agarose adicionou-se 0,5µg/ml de brometo de etídio (Sigma).

O gel solidificado em suporte próprio equipado com um pente, foi colocado na tina de electroforese (GNA-100 – Amersham Pharmacia Biotech) com tampão TBE 1x como electrólito. Para a electroforese misturaram-se 10 µl de cada produto de amplificação a 3 µl de uma solução de aplicação (0,1 g de azul de bromofenol, 16 g de sacarose e H₂O estéril a perfazer 40 ml, distribuída em aliquotas e esterilizada). As amostras foram sujeitas a um campo eléctrico de 100 V durante 60 minutos a partir de um aparelho EPS 301 – Amersham Pharmacia Biotech.

Em simultâneo, aplicou-se um marcador de pesos moleculares, pUC MixMarker8 ou GeneRuler 50 pb Ladder (Fermentas) e os vários controlos. A visualização foi efectuada em transiluminador e fotografado em aparelho Eagle Eye II (Stratagene).

2.3. Subtipagem genómica de *Treponema pallidum*

2.3.1. Análise de gene *tpr* por nested PCR – RFLP

A montagem da técnica baseou-se na executada por Pillay *et al* (1998), tendo sido optimizada para as condições e equipamento existentes na unidade de DST. Utilizaram-se as sequências iniciadoras descritas pelos mesmos autores: B1 e A2 para a primeira amplificação e IP6 e IP7 para a segunda (Tabela 46).

Para a optimização da técnica, utilizou-se o ADN extraído de coelho inoculado com estirpe de Nichols de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*.

Amplificação de um fragmento do gene *tpr*

Para a primeira amplificação foi efectuada uma mistura de reacção com um volume final de 100 µl, uma solução em água pura contendo 10 µl de Tampão PCR 1x (fornecido com a enzima utilizada), 1mM de cada dNTP (dATP, dCTP,

dCGT, dTTP - Amersham Pharmacia Biotech), diferentes concentrações de cloreto de magnésio de 1,5 mM a 4 mM, concentração de 100, 50, ou 25 pmol de cada uma das sequências iniciadoras B1 e A2 e 5 U/μl da enzima ADN polimerase Immolase (Bioline).

O produto da primeira amplificação de PCR foi usado para uma segunda amplificação, sendo a mistura de reacção idêntica à primeira, com excepção das sequências iniciadoras, em que se utilizou IP6/IP7 (Tabela 46), e efectuadas variações nas concentrações dos reagentes, a fim de obter as melhores condições de amplificação.

Tabela 46. Sequências iniciadoras para amplificação do gene *tpr*

Sequência iniciadoras	Oligonucléotidos	Gene alvo
B1-F*	5'- ACTGGCTCTGCCACACTTGA - 3'	<i>tpr</i>
A2-R*	5'- CTACCAGGAGAGGGTGACGC - 3'	
IP6-F*	5'-CAGGTTTTGCCGTTAAGC - 3'	
IP7-R*	5'- AATCAAGGGAGAATACCGTC - 3	

F – “forward” – sequência a montante da região a estudar

R – “reverse” – sequência a jusante da região a estudar

* descritos em Pillay *et al.* (1998)

As condições da primeira amplificação consistiram num passo inicial de activação da enzima utilizada e desnaturação dos ácidos nucleicos a 95°C durante sete minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C durante um minuto, hibridação das sequências iniciadoras de 55° a 62°C durante um minuto e extensão a 72°C durante dois minutos, com uma extensão final de 15 minutos a 72°C. Para a segunda amplificação foram experimentadas as mesmas condições, com variações na temperatura de hibridação das sequências iniciadoras.

A visualização dos produtos de amplificação foi efectuada do modo descrito para

a PCR diagnóstica, com excepção de se ter utilizado agarose a 1% e, como marcador de peso molecular, o GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas). Quando amplificado o ADN extraído de *T. pallidum* estirpe de Nichols, o produto da primeira amplificação foi visualizado ao nível de 2186 pb e o da segunda amplificação a 1836 pb.

A quantidade de produto da primeira amplificação a ser utilizado na segunda, foi calculada, pela observação da intensidade de fluorescência do fragmento. O mesmo procedimento foi utilizado para determinar a quantidade de produto da segunda amplificação a hidrolizar com a enzima de restrição *MseI*.

Após a obtenção das condições mais adequadas, estas foram aplicadas ao estudo do ADN de amostras positivas pela técnica PCR-diagnóstica.

Análise de restrição dos produtos de amplificação do gene *tpr* -RFLP

Os produtos de PCR atrás obtidos foram em seguida analisados pela técnica de RFLP, sendo submetidos à acção da enzima *Mse I* (GIBCO/Life Technologies) na concentração de 5 U/ μ l. A mistura de digestão foi constituída por uma quantidade de produto variável, consoante o rendimento da amplificação, 0,5 μ l da enzima *MseI*, 1,5 μ l de Tampão da enzima 10x 1,5 μ l e água até perfazer um volume total de 15 μ l por reacção. Os microtubos, com as misturas de digestão, foram incubados em banho-maria a 37°C durante a noite.

A separação dos fragmentos de restrição foi feita em gel de agarose a 1,5%, preparado como referido anteriormente, utilizando o marcador GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas), e aplicado um campo eléctrico de 100 V durante uma hora, sendo em seguida visualizado e fotografado em aparelho Eagle Eye II (Stratagene).

2.3.2. Análise de gene *arp* por PCR

A técnica foi de início, optimizada, utilizando-se o ADN extraído de extracto de *T. pallidum* obtido de coelho inoculado com estirpe de Nichols de *T. pallidum*, de modo a ser em seguida aplicada ao estudo das amostras positivas por PCR diagnóstica.

As sequências iniciadoras ARP-1 e ARP-2 (Tabela 47), referidas em Pillay *et al.* (1998), que amplificam fragmentos de várias dimensões, dependendo do número de repetições existentes no gene, foram utilizadas. Para o gene da estirpe de Nichols de *T. pallidum* o fragmento amplificado é de 1155 pb.

Tabela 47. Sequências iniciadoras para amplificação do gene *arp*

Sequências iniciadoras	Oligonucléotidos	Gene alvo
ARP-1 F*	5'-CAAGTCAGGACGGACTGTCC-3'	<i>arp</i>
ARP-2 R*	5'-CTACCAGGAGAGGGTGACGC-3'	

F – “forward”= sequência a montante da região a estudar

R – “reverse”= sequência a jusante da região a estudar

* descritos por Pillay *et al.* (1998)

A mistura para a reacção da PCR em água pura, foi efectuada com os diferentes reagentes em concentrações variáveis: 1mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dCGT, dTTP - Amersham Pharmacia Bbiotech), diferentes concentrações – 1,5 mM a 4 mM – de cloreto de magnésio, concentração de 100 pmol, 50 pmol, ou 25 pmol das sequências iniciadoras ARP-1 e ARP-2, 10 µl de Tampão PCR 10x (da enzima utilizada), 1 U/µl de Immolase ADN polimerase (Bioline) para um volume final de 100 µl, por reacção.

Para a amplificação usou-se o termociclador PCR Express (HYBAID), tendo-se programado o mesmo com temperatura inicial de 95°C durante cinco minutos a fim de activar a enzima ADN polimerase, seguida de 35 a 45 ciclos com uma fase de desnaturação a 94°C durante um minuto, ligação das sequências iniciadoras de 57°C a 62°C e extensão a 72°C durante dois minutos e 30 segundos. Aos ciclos seguiam-se uma extensão final a 72°C durante 15 minutos.

A visualização dos produtos de amplificação, foi efectuada do modo anteriormente descrito. Sempre que se amplificou ADN de *T. pallidum* estirpe de Nichols o produto obtido era visualizado ao nível de 1155 pb.

2.4. Prevenção de contaminações nas reacções da PCR

A fim de prevenir contaminações nas reacções de PCR tiveram-se em conta os seguintes cuidados:

1. A extracção de ADN, preparação das misturas de reacção e a pipetagem de ADN para a técnica PCR realizaram-se em espaços diferentes.
2. Antes da sua utilização todos os tubos “Eppendorf” contendo amostras de ADN, produtos de amplificação e reagentes foram centrifugados em microcentrifuga para retirar gotas de condensação das tampas.
3. Utilização generalizada em todas as manipulações de pontas com filtro.
4. Todas as micropipetas foram limpas, após utilização, com papel humidificado com etanol a 70%.
5. Antes de qualquer reagente ser colocado nas bancadas estas foram limpas com mistura de hipoclorito de sódio a 10%.
6. As experiências com utilização da enzima de restrição executaram-se em laboratório diferente do utilizado para os ensaios da PCR.
7. As câmaras utilizadas nas diferentes manipulações e as micropipetas eram após utilização submetidas à acção de ultra-violetas.

2.5. Estudo de amostras clínicas

Após a obtenção das melhores condições de amplificação para a técnica de PCR-diagnóstica, relativamente a cada um dos pares de sequências iniciadoras, efectuou-se o estudo de vários tipos de amostras clínicas.

Embora as diferentes técnicas de PCR-diagnóstica resultassem satisfatoriamente quando da utilização do ADN de *T. pallidum* e com a maioria das amostras de ADN extraído de exsudados de lesões sifilíticas, o mesmo não sucedeu em relação às amostras de sangue total, soro ou liquor. Em relação à técnica de multiplex-PCR (M-PCR) esse facto tornou-se ainda mais evidente, sendo o par KO3A/KO4 e *polA-F/polA-R* aquele com que se obtiveram melhores resultados.

Assim, e também por uma questão de uniformização, os diferentes tipos de amostras (sangue, soro, plasma, exsudado de lóbulo de orelha, liquor e lesões)

foram estudadas por três técnicas de PCR-diagnóstica, utilizando-se o par de sequências iniciadoras KO3A/KO4 para o gene *Tp47*, o par de sequências iniciadoras *polA-F/polA-R* para o gene *polA* e a sua associação na mesma mistura de reacção para a PCR multiplex, os quais passaram a designar-se por PCR-47, PCR-*polA* e PCR-M, respectivamente.

Após a obtenção das melhores condições para o estudo de genotipagem de *T. pallidum*, efectuou-se o estudo de algumas das amostras positivas pela técnica de PCR-diagnóstica com o objectivo de se determinar o seu genótipo.

3. Resultados

3.1. Optimização da PCR-diagnóstica

Gene da lipoproteína de 47 kDa (*Tp* 47)

A amplificação de um fragmento do gene da lipoproteína de 47 kDa (*Tp* 47) com o par de sequências iniciadoras KO3A/KO4 foi controlada pela presença de uma banda de 260 pb.

As melhores condições de amplificação para este par de sequências iniciadoras obtiveram-se com as concentrações de 1,5 μ M e 3 mM para as sequências iniciadoras e $MgCl_2$, respectivamente, e para ambas as enzimas utilizadas (ADN polimerase “Taq” e “Immolase”). No que se refere aos ciclos de amplificação conseguiram-se melhores resultados com 40 ciclos e uma temperatura de ligação de 62°C durante 20 segundos, seguidos de extensão final de 72°C durante cinco minutos. Na Figura 15 apresenta-se uma fotografia das resultantes das experiências de optimização, tratando-se de um gel de agarose a 1,5%, em que existem controlos, negativo de reacção e positivo, com diferentes concentrações de $MgCl_2$ utilizando a enzima ADN polimerase “Immolase” com as condições de temperatura já optimizadas.

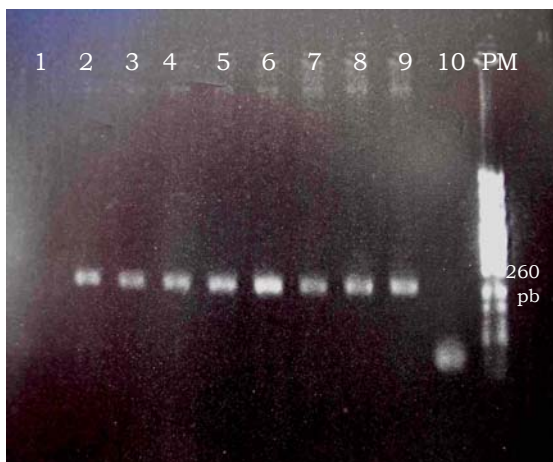


Figura 15. Optimização das condições de amplificação de um fragmento do gene *Tp*47 com as sequências iniciadoras KO3A/KO4. 1 – Controlo negativo (CN), 2 e 3 – Controlo positivo (CP) com 2 mM $MgCl_2$, 4 e 5 – CP com 2,5 mM $MgCl_2$, 6 e 7 – CP com 3 mM $MgCl_2$, 8 e 9 – CP com 3,5 mM $MgCl_2$, 10 – CN

As condições otimizadas, foram experimentadas na amplificação de ADN extraído de amostras clínicas, provenientes dos doentes. Na Figura 16 pode observar-se a fotografia de um gel efectuada para a visualização de produtos amplificados, a partir de ADN extraído de diferentes tipos de amostras: exsudados de úlcera genital e de lesão cutânea, sangue total, liquor e exsudado de biopsia do lóbulo de orelha.

A técnica aplicada aos diferentes tipos de amostras permitiu amplificar banda do dimensão esperado, sendo de realçar que as amostras com melhor amplificação foram as de ADN extraído de úlcera genital e lesão cutânea, enquanto que a de menor produção foi a de liquor.

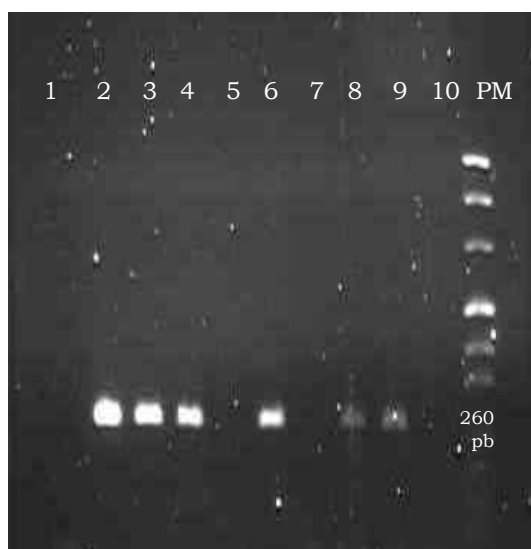


Figura 16. Visualização dos produtos de amplificação de ADN de amostras clínicas com a utilização das sequências iniciadoras KO4A/KO3. 1 – CN, 2 – CP, 3 – ADN de exsudado de úlcera genital, 4 – ADN de exsudado de lesão cutânea 5 – ADN de controlo negativo de exsudado de úlcera genital, 6 – ADN de exsudado de lóbulo de orelha, 7 – ADN de controlo negativo de sangue total 8 – ADN de amostra de LCR, 9 – ADN de amostra de sangue total, 10 – controlo negativo de LCR

A amplificação de um fragmento do mesmo gene (*Tp47*), utilizando as sequências iniciadoras 47-F/47-R desenhadas no programa “Primer Express”, levou à produção de um fragmento de ADN com 301 pb. As melhores condições de amplificação com a utilização deste par de sequências iniciadoras e para ambas as enzimas foram as obtidas com as concentrações de 0,5 μ M para as sequências iniciadoras e de 2,5 mM para o $MgCl_2$, com 35 ciclos com temperatura de ligação de 57°C, durante 20 segundos, seguidos de uma extensão final de cinco minutos a 72°C.

Na Figura 17 mostra-se uma das fotografias das experiências efectuadas com estas sequências iniciadoras, isto é, um gel de agarose a 1,5%, após corrida electroforética dos produtos de amplificação dos controlos negativo de reacção e positivo, com as condições de temperatura optimizadas e diferentes concentrações de $MgCl_2$: 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM e 3 mM.



Figura 17. Optimização das condições de amplificação de um fragmento do gene *Tp47* de *T. pallidum* com as sequências iniciadoras 47-F/47-R. 1 – CN, 2 – CP com 1,5 mM $MgCl_2$, 3 – CP com 2 mM $MgCl_2$, 4 – CP com 2,5 mM $MgCl_2$, 5 – CP com 3 mM $MgCl_2$.

Gene da enzima ADN polimerase I (*polA*)

A amplificação de um fragmento do gene da ADN polimerase I efectuada com as sequências iniciadoras *polA*-F/*polA*-R produz um produto com 378 pb.

Os melhores resultados foram obtidos pela utilização da enzima ADN polimerase “Immolase” com as sequências iniciadoras na concentração de 1,25 μ M e $MgCl_2$ 3 mM. Relativamente às condições de amplificação, os melhores resultados foram alcançados com a temperatura de ligação de 62°C durante 30 segundos, por 45 ciclos e extensão final de 15 minutos a 72° C.

Na Figura 18 pode observar-se a fotografia de dois géis onde se efectuou a electroforese dos produtos de amplificação do controlo positivo, utilizando-se as condições referidas no parágrafo anterior para optimização da técnica, com diferentes concentrações de $MgCl_2$.

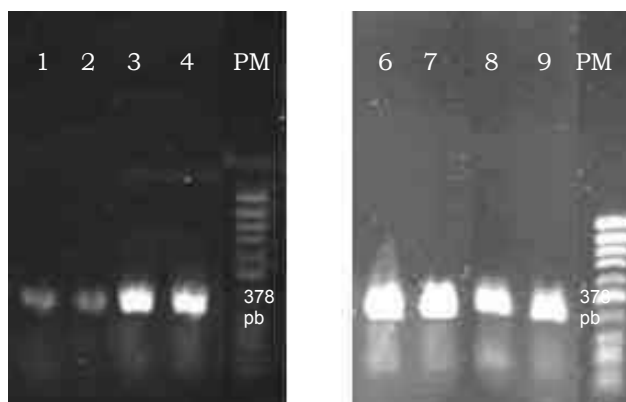


Figura 18. Optimização da técnica de PCR-diagnóstica com as sequências iniciadoras *polA-F/polA-R* utilizando-se controlo positivo e diferentes concentrações de $MgCl_2$. 1 e 2 – 1,5 mM de $MgCl_2$; 3 e 4 – 2 mM de $MgCl_2$, 6 e 7 – 3 mM, 8 e 9 – 3,5 mM.

As condições optimizadas foram em seguida aplicadas para a amplificação de ADN extraído de amostras clínicas. Na Figura 19 encontra-se um exemplo da aplicação desta PCR-diagnóstica (PCR-*polA*) ao estudo do ADN extraído de diferentes tipos de amostras clínicas. Na fotografia do gel pode visualizar-se os resultados obtidos pela aplicação da técnica a controlos, positivo e negativo, ao ADN extraído de amostras, isto é, úlcera genital, lesão cutânea, sangue total, liquor e ADN de duas amostras (sangue total e exsudado de lesão cutânea) de indivíduos sem infecção a *T. pallidum*. A aplicação destas sequências iniciadoras   amplificação de ADN, extraído de amostras clínicas, permitiu a produção de banda de dimensão esperada (378pb), sendo de salientar que a melhor produção foi obtida quando da amplificação a partir de amostras de úlcera genital e lesões cutâneas específicas, e a menor a partir de liquor.



Figura 19. Visualização dos produtos de amplificação de ADN de amostras clínicas, com a utilização das sequências iniciadoras *polA-F/polA-R*. 1 – CN, 2 – CP, 3 – exsudado de úlcera genital, 4 – exsudado de lesão cutânea, 5 – CN de lesão cutânea, 6 – sangue total, 7 – liquor, 8 – CN de sangue total, 9 – CN de liquor

A utilização das sequências iniciadoras desenhadas no programa “Primer Express” *polA-F/polA-R* (PE) amplifica um fragmento de 460 pb. Relativamente a este par de sequências iniciadoras foram obtidas como as melhores condições de amplificação as concentrações de 0,5µM para as sequências iniciadoras e 3 mM para o MgCl₂, com a temperatura de ligação de 57°C durante 30 segundos e 35 ciclos, seguidos de uma extensão final de cinco minutos 72°C.

A Figura 20 ilustra a fotografia de um gel de agarose a 1,5%, onde se efectuou electroforese simultânea dos produtos de amplificação por PCR, do ADN extraído do controlo positivo e de diferentes tipos de amostras (exsudado de úlcera genital e lesão cutânea, sangue total) usando os dois pares de sequências iniciadoras *polA-F/polA-R* – PE e *polA-F/polA-R* que amplificam fragmentos do gene *polA*.



Figura 20. Resultados obtidos pela aplicação da técnica de PCR optimizada utilizando-se as sequências iniciadoras *polA-F/polA-R* (PE) em A e *polA-F/polA-R* em B. 1 e 11 – CN; 2, 6, 12, 15 – CP; 3, 7, 13, 16 – ADN de exsudado de úlcera genital; 4, 8 – ADN de sangue total; 5, 9, 14, 17 – ADN de exsudado de biopsia de lóbulo de orelha, com as concentrações de MgCl₂ de 3,5mM de 1 a 5 e 11 a 15 e de 3 mM de 6 a 9 e 15 a 17.

A utilização das sequências iniciadoras *polA-F/polA-R* (PE) e *polA-F/polA-R*, para amplificação de um fragmento do gene *polA*, permitiu a produção de um fragmento de 406 e 378 pb, respectivamente, quer na utilização de ADN do controlo positivo quer do extraído de amostras clínicas. No entanto, é de salientar que essa produção foi baixa quando se utilizaram as sequências iniciadoras *polA-F/polA-R* (PE) para a amplificação do ADN extraído de amostras clínicas sobretudo de sangue total, sendo a mesma boa quando se utilizaram as sequências iniciadoras *polA-F/polA-R*. As variações na concentração do MgCl₂

de 3,5 para 3 mM melhoram a produção de produto de amplificação quando utilizadas as sequências iniciadoras *polA-F/polA-R*, mas o mesmo não se verificou com as sequências iniciadoras *polA-F/polA-R* (PE).

PCR-multiplex (PCR-M)

Após a obtenção das melhores condições de amplificação, para cada um dos pares de sequências iniciadoras utilizadas no estudo, utilizou-se em simultâneo, na mesma mistura de reacção, de cada um deles tendo como alvo um gene diferente de acordo com o seguinte esquema: 47-R/47-F e *polA-F/polA-R* (PE), 47-R/47-F e *polA-F/polA-R*, KO3A/ KO4 e *polA-F/polA-R* (PE), e KO3A/KO4 e *polA-F/polA-R*. A utilização deste processo resultaria num método mais seguro sensível e específico para aplicação ao diagnóstico laboratorial de rotina.

A associação entre as sequências iniciadoras 47-R/47-F para o gene da lipoproteína de 47kDa (*Tp47*), e *polA-F/polA-R* (PE), para o gene da enzima ADN polimerase I (*polA*), ambas desenhadas no programa “Primer Express” não resultou, em diferentes condições experimentadas, tendo-se obtido baixa ou nenhuma produção de amplificação com o controlo positivo, sobretudo para o gene *polA*.

Associando-se as sequências iniciadoras 47-R/47-F para o gene *Tp47* desenhadas no programa “primer Express” e o par *polA-F/polA-R* para o gene *polA*, com base na descrição de Liu *et al.* (2001) na mesma mistura de reacção, obteve-se a produção de fragmentos de ADN visualizáveis ao nível de 301 e 378 pb.

Para estas sequências iniciadoras as melhores condições de amplificação conseguiram-se com a utilização da enzima ADN polimerase “Immolase”, com as concentrações de 0,5 µM para as sequências iniciadoras 47-R/47-F e de 1,25 µM *polA F/polA-R* e uma concentração de MgCl₂ de 2,5 mM, temperatura de ligação de 60°C durante 30 segundos em 40 ciclos.

Na Figura 21 pode observar-se um exemplo das experiências efectuadas com as sequências iniciadoras anteriormente referidas (47-R/47-F e *polA F/polA-R*). A

utilização das duas sequências iniciadoras na mesma mistura de reacção permitiu a produção de duas bandas do tamanho esperado (301 e 378 pb) quando amplificado ADN de controlo positivo e para as diferentes concentrações de $MgCl_2$ (1,5mM, 2 mM, 2,5 mM e 3M) com melhores resultados quando utilizado 2,5 ou 3 mM de $MgCl_2$. A produção das duas bandas esperadas quando da amplificação de ADN extraído de amostras clínicas com as mesmas sequências iniciadoras só foi obtida com as concentrações de 2,5 ou 3 mM de $MgCl_2$, sendo melhor com a primeira e apenas para úlcera genital. As experiências com outros tipos de amostras resultaram com baixa amplificação do gene *Tp47*.

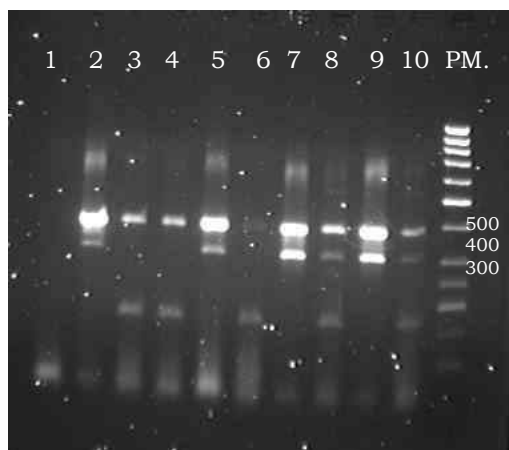


Figura 21. Optimização da PCR-M, com as sequências iniciadoras 47-R/47-F e *polA*-F/*polA*-R. 1 – CN, 2 – CP, 3, 6, 8 e 10 – ADN de uma amostra de úlcera genital, 4 – ADN de amostra de lesão cutânea, com as variações na concentração de $MgCl_2$ de 1,5 mM (1 a 4), 2 mM (5 e 6), 2,5 mM (7 e 8) e 3 mM (9 e 10).

A associação entre as sequências iniciadoras KO3A/KO4 e o *polA*-F/*polA*-R, com as quais se obtêm fragmentos de ADN de 260 e 378 pb, respectivamente, foi experimentada. Os melhores resultados da utilização destas sequências iniciadoras alcançaram-se com as concentrações de 1,25 μ M para ambas as sequências iniciadoras, concentração de $MgCl_2$ de 3mM e temperatura de ligação de 62°C com 45 ciclos de 30 segundos.

A fotografia da Figura 22 corresponde a um gel efectuado de acordo com as condições referidas no parágrafo anterior, com variações na concentração de $MgCl_2$ aplicadas ao ADN extraído de diferentes tipos de amostras. A produção de fragmentos da dimensão esperada (260 e 378 pb) foi possível com as sequências iniciadoras KO3A/KO4 e o *pol A*-F/*polA*-R, quando utilizado ADN do

controle positivo e do extraído de amostras clínicas sobretudo de úlceras e lesões, sendo a mesma mais evidente quando utilizado 3 mM de $MgCl_2$.

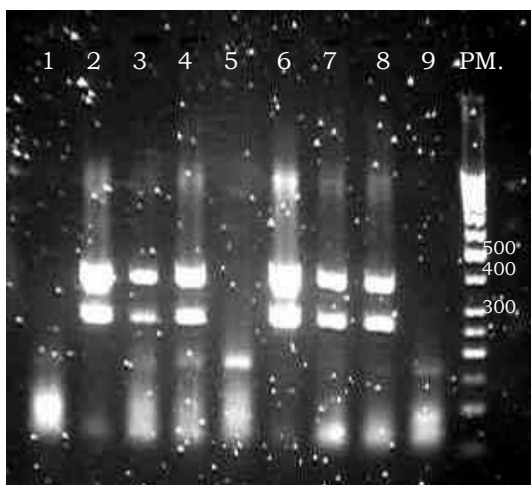


Figura 22. Optimização da técnica de PCR-M com as sequências iniciadoras KO4A/KO3 e *polA-F/polA-R*. 1 – CN, 2 e 6 – CP, 3 e 7 – ADN de amostra de úlcera genital, 4 e 8 – ADN de amostra de lesão cutânea, 5 e 9 – ADN de uma amostra de soro. Variações na concentração de $MgCl_2$ de 2,5 mM (1 a 4), e de 3 mM (5 a 9).

De todas as associações utilizadas, esta última (sequências iniciadoras KO4A/KO3 e *polA/polA*) foi a que originou melhores resultados ou seja uma visualização mais clara dos produtos de amplificação, pelo que foi a única efectuada no estudo das amostras clínicas.

3.2. Resultados PCR-diagnóstica das amostras clínicas

Para apresentação dos resultados obtidos pela aplicação da técnica de PCR-diagnóstica aos diversos tipos de amostras, subdividiram-se os doentes estudados em dois grupos: um grupo de doentes com sífilis em curso (sífilis primária, secundária, latente e neurosífilis - Grupo I) e outro de doentes sem sífilis em curso (Grupo II) esquematizados na Tabela 48. As seguintes amostras foram analisadas: sangue com EDTA e plasma (128), soro (176), de exsudado de biopsia de lóbulo de orelha (52), de exsudados de úlcera genital (8) e lesões cutâneas (6), pelas três técnicas de PCR-diagnóstica (PCR-47, PCR-*polA* e PCR-M) cujos resultados se encontram resumidos na Tabela 48.

Das 91 amostras de sangue total e plasma dos doentes do Grupo I estudadas

pelas técnicas de PCR-47, PCR-*polA* e PCR-M obteve-se uma percentagem de positividade de 45,1% (41/91), 34,1% (31/91) e 31,9% (29/91) para as primeiras e 51,6% (47/91), 44,0 % (40/91) e 36,3% (33/91) para as segundas, pelas técnicas de PCR-47, PCR-*polA* e PCR-M, respectivamente, verificando-se que o plasma parece ser mais sensível que o sangue total.

Tabela 48. Resultados obtidos nas diversas amostras clínicas analisadas pelas técnicas de PCR-diagnóstica

	Grupo I			Grupo II		
	PCR-47 Nº + /total (%+vos)*	PCR- <i>polA</i> Nº + /total (%+vos)	PCR-M Nº + /total (%+vos)	PCR-47 Nº + /total (%+vos)	PCR- <i>polA</i> Nº + /total (%+vos)	PCR-M Nº + /total (%+vos)
Sangue	41/91 (45,1%)	31/91 (34,1%)	29/91 (31,9%)	1/37 (2,7%)	1/37 (2,7%)	1/37 (2,7%)
Plasma	47/91 (51,6%)	40/91 (44,0%)	33/91 (36,3%)	1/37 (2,7%)	1/37 (2,7%)	1/37 (2,7%)
Soro	37/128 (28,9%)	29/127 (22,8%)	21/120 (17,5%)	1/48 (2,1%)	0/48 (0%)	0/43 (0%)
Ex. lób or.**	24/39 (61,5%)	23/39 (59,0%)	22/39 (56,4%)	1/13 (7,7%)	0/13 (0%)	1/13 (7,7%)
Exs. úlcera	4/4 (100%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
Exs. lesão	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)

*- (%+vos) – Nº de positivos/total estudado

** - Ex. lób. or. - Exsudado de biopsia de lóbulo de orelha

A totalidade das amostras de soros estudados neste grupo foi de 128, verificando-se que a técnica de PCR-47 detectou 28,9% (37/128) de amostras positivas, a PCR-*polA* 22,8% (29/127) e a PCR-M 17,5% (21/120). Nas amostras de exsudados do lóbulo da orelha (39) observou-se uma banda de amplificação específica em 61,5% (24/39) pela técnica de PCR-47, em 59% (23/39) pela

técnica de PCR-*polA* e em 56,4% (22/39) pela técnica de PCR-M.

As amostras de exsudado de úlceras genitais foram todas positivas 100% (4/4), enquanto que as de lesões cutâneas foram 66,7% (2/3), sendo estes resultados iguais para todas as técnicas de PCR estudadas.

Para verificar se o facto de se efectuarem, simultaneamente, várias técnicas de PCR em vários tipos de amostras (sangue total, plasma, soro e exsudado de biopsia de lóbulo de orelha) aumentaria a detecção de casos positivos analisou-se, um conjunto de amostras constituído por esses quatro tipos de amostras provenientes de 35 doentes deste grupo.

Nas amostras estudadas (140 - quatro tipos de amostras x 35 indivíduos), 74/140 (52,9%) foram negativas com todas as técnicas utilizadas, enquanto que 66/140 (47,1%) resultaram positivas, pelo menos por uma das técnicas PCR-diagnóstica (Tabela 49).

Em relação a estas amostras em que pelo menos uma das técnicas resultou positiva (66), 46/140 (32,9%) apresentaram resultados positivos pelos três métodos e em 20/140 (14,3%) existiu discrepância, observando-se que em 9/140 (6,4%) das amostras foram positivas pelos métodos PCR-*polA* e PCR-47, em 2/140 (1,4%) pelas técnicas PCR-47 e PCR-M, 7/140 (5%) pela PCR-47 e em 2/140 (1,4%) pela PCR-*polA*.

Tabela 49. Resultados obtidos no total de amostras (140) estudadas por todas as técnicas de PCR-diagnóstica

		PCR-47	
		Negativo	Positivo
PCR-M -vo	PCR- <i>polA</i> -vo	74	7
	PCR- <i>polA</i> +vo	2	9
PCR-M +vo	PCR- <i>polA</i> -vo	0	2
	PCR- <i>polA</i> +vo	0	46

Em seguida, efectuou-se a análise dos resultados obtidos por cada tipo de técnica de PCR-diagnóstica em relação com o tipo de amostra (Tabela 50, 51 e

52), tendo-se verificado a existência de 11/35 (31,4%), 12/35 (34,3%) e 13/35 (37,1) resultados em que todas as amostras foram negativas, 9/35 (25,7%), 7/35 (20%) e 6/35 (17,1%) em que foram todas positivas e 15/35 (42,9%), 16/35 (45,7%) e 16/35 (45,7%) em que os resultados demonstraram ser discrepantes, pela PCR-47 (Tabela 50), PCR-*polA* (Tabela 51) e PCR-M (Tabela 52), respectivamente.

Tabela 50. Resultados obtidos pela técnica de PCR-47 nos diferentes tipos de amostras

			PCR-47 -vo (plasma)	PCR-47 +vo (plasma)
PCR-47 -vo (exs. lob. orelha)	PCR-47 -vo (soro)	PCR-47 -vo (sangue)	11	0
		PCR-47 + vo (sangue)	0	1
	PCR-47 +vo (soro)	PCR-47 + vo (sangue)	0	1
PCR-47 +vo (exs. lob. orelha)	PCR-47 -vo (soro)	PCR-47 -vo (sangue)	6	1
		PCR-47 + vo (sangue)	3	1
	PCR-47 +vo (soro)	PCR-47 -vo (sangue)	0	2
		PCR-47 + vo (sangue)	0	9

Tabela 51. Resultados obtidos pela técnica de PCR-*polA* nos diferentes tipos de amostras

			PCR-47 -vo (plasma)	PCR-47 +vo (plasma)
PCR- <i>polA</i> -vo (exs.lob.orelha)	PCR- <i>polA</i> -vo (soro)	PCR- <i>polA</i> -vo (sangue)	12	1
		PCR- <i>polA</i> +vo (sangue)	1	0
PCR- <i>polA</i> +vo (exs.lob.orelha)	PCR- <i>polA</i> -vo (soro)	PCR- <i>polA</i> -vo (sangue)	5	3
		1 PCR- <i>polA</i> +vo (sangue)	1	2
	PCR- <i>polA</i> +vo (soro)	PCR- <i>polA</i> -vo (sangue)	1	2
		PCR- <i>polA</i> +vo (sangue)	0	7

Tabela 52. Resultados obtidos pela técnica de PCR-M nos diferentes tipos de amostras

			PCR-47 -vo (plasma)	PCR-47 +vo (plasma)
PCR-M -vo (exs.lob.orelha)	PCR-M -vo (soro)	PCR-M -vo (sangue)	13	1
		PCR-M +vo (sangue)	1	0
PCR-M +vo (exs.lob.orelha)	PCR-M -vo (soro)	PCR-M -vo (sangue)	9	0
		PCR-M +vo (sangue)	2	3
	PCR-M +vo (soro)	PCR-M +vo (sangue)	0	6

Pela análise dos resultados discrepantes verificou-se que com a técnica PCR-47, as amostras de exsudado de biopsia de lóbulo de orelha e plasma, quando estudadas em simultâneo, identificaram, em todos os casos, resultados positivos enquanto que, na PCR-*poLA* e PCR-M estes dois tipos de amostra não identificaram senão um positivo cada.

A análise dos resultados obtidos com os três métodos de PCR-diagnóstica foi , também, feita de acordo com o diagnóstico clínico e laboratorial, isto é, sífilis primária, secundária e latente, estando os resultados esquematizados respectivamente nas Tabela 53, 54 e 55

Tabela 53. Resultados obtidos com a técnica de PCR-47 nas várias amostras, de acordo com o diagnóstico clínico e laboratorial do grupo I

	Sangue Nº + / total (% positivos)	Plasma Nº + / total (% positivos)	Soro Nº + / total (% positivos)	Exs. lob. orelha Nº + / total (% positivos)
Sífilis recente	10/15 (66,7%)	11/15 (73,3%)	9/17 (52,9%)	5/6 (83,3%)
Sífilis secundária	4/7 (57,1%)	5/7 (71,4%)	6/19 (31,6%)	3/4 (75%)
Sífilis latente	27/69 (39,1%)	31/69 (44,9%)	19/84 (22,6%)	16/29 (55,2%)

Tabela 54. Resultados obtidos com a técnica de PCR-*polA* nas várias amostras de acordo com o diagnóstico clínico e laboratorial do grupo I

	Sangue Nº + / total (% positivos)	Plasma Nº + / total (% positivos)	Soro Nº + / total (% positivos)	Exs. lob. orelha Nº + / total (% positivos)
Sífilis recente	8/15 (53,3%)	10/15 (66,7%)	6/17 (35,3%)	5/6 (83,3%)
Sífilis secundária	4/7 (57,1%)	5/7 (71,4%)	6/19 (31,6%)	3/4 (75%)
Sífilis latente	19/69 (27,5%)	25/69 (36,2%)	15/83 (18,1%)	15/29 (51,7%)

Tabela 55. Resultados obtidos com a técnica de PCR-M de acordo com o diagnóstico clínico e laboratorial do grupo I

	Sangue Nº + / total (% positivos)	Plasma Nº + / total (% positivos)	Soro Nº + / total (% positivos)	Exs. lob. orelha Nº + / total (% positivos)
Sífilis recente	8/15 (53,3%)	10/15 (66,7%)	5/17 (29,4%)	5/6 (83,3%)
Sífilis secundária	2/7 (28,6%)	5/7 (71,4%)	5/18 (27,8%)	3/4 (75%)
Sífilis latente	19/69 (27,5%)	18/69 (26,1%)	10/77 (13%)	14/29 (48,3%)

No grupo de doentes com sífilis primária observou-se positividade em 66,7% (10/15), das amostras de sangue pela técnica de PCR-47 e em 53,3% (8/15) quando a amplificação foi efectuada por PCR-*polA* e PCR-M.

Na sífilis secundária e no mesmo tipo de amostra, a positividade foi de 57,1% (4/7), para as duas primeiras técnicas e de 28,6% (2/7) para a terceira. Obtiveram-se 73,3% (11/15) de resultados positivos nas amostras de plasma dos doentes com sífilis primária com a técnica de PCR-47, sendo essa percentagem de 66,7% (10/15) no estudo pelas técnicas *pol-A* e PCR-M. Relativamente ao grupo de doentes com sífilis secundária e no mesmo tipo de amostra, a positividade foi de 71,4% (5/7) para as três técnicas efectuadas.

Nas amostras de soro, a positividade encontrada foi de 52,9% (9/17), 35,3% (6/17) e 29,4% (5/17) respectivamente pelas técnicas PCR-47, PCR-*polA* e PCR-M nos doentes com sífilis primária, enquanto que nos doentes com sífilis secundária foi de 31,6% (6/19) para as duas primeiras técnicas e de 27,8% (5/18) para a última.

Nos grupos de doentes com sífilis primária e sífilis secundária a percentagem de positividade encontrada nas amostras de exsudado de biopsia de lóbulo de orelha foi respectivamente de 83,3% (5/6) e 75% (3/4,) para os três métodos estudados.

Nos indivíduos com sífilis latente, a percentagem de amostras positivas foi de 39,1% (27/69) pela técnica PCR-47 e de 27,5% (19/69) para as outras duas nas amostras de sangue, sendo de 44,9% (31/69), 36,2% (25/69) e 26,1% (18/69) no plasma, 22,6% (19/84), 18,1% (15/83) e 13% (10/77) no soro e 55,2% (16/29), 51,7% (15/29) e 48,3% (14/29) no exsudado de biopsia de lóbulo de orelha respectivamente, para cada técnica estudada.

No que se refere ao grupo II (Tabela 48), apenas as seguintes amostras foram positivas: uma de soro e outra de exsudado de biopsia de lóbulo de orelha, as únicas obtidas de um doente com sífilis, tratado cerca de um mês antes da colheita, nas quais apenas a técnica de PCR-47 foi positiva e uma amostra de sangue e outra de plasma das quatro estudadas (sangue, plasma, soro e exsudado de lóbulo de orelha) provenientes de um indivíduo que tinha tido contacto, com um doente com sífilis, nas quais todas as técnicas de PCR foram positivas.

Todas as técnicas de PCR utilizadas foram negativas nos exsudados de úlceras genitais e de lesões cutâneas nos doentes do Grupo II.

A técnica de PCR-diagnóstica foi, também, aplicada ao estudo de amostras de liquor. Foram estudados 124 amostras de liquor provenientes de indivíduos com sífilis, aos quais foi efectuada punção lombar com o objectivo de exclusão de diagnóstico de neurosífilis e 37 do grupo controlo negativo, referido no

capítulo 3 deste trabalho, provenientes de indivíduos sem sífilis e nos quais todos os testes serológicos para diagnóstico de sífilis executados no soro e liquor, foram negativos. Todas as amostras deste grupo resultaram negativas pelas três técnicas de PCR em estudo.

Os resultados obtidos com as técnicas de PCR-diagnóstica nas 124 amostras liquor, de doentes com sífilis, estão descritos na Tabela 56, tendo-se encontrado uma positividade de 29,8% (37/124), 24,2% (30/124) e de 16,1% (20/124), respectivamente, pelas técnicas de PCR-47, PCR-*polA* e PCR-M.

Tabela 56. Resultados obtidos com as várias técnicas PCR-diagnóstica nas amostras de liquor

PCR-diagnóstica		
PCR-47	PCR- <i>polA</i>	PCR-M
Nº + /total (%+vos)	Nº + /total (%+vos)	Nº + /total (%+vos)
37/124	30/124	20/124
(29,8%)	(24,2%)	(16,1%)

A discriminação dos resultados encontra-se esquematizada na Tabela 57, onde se verifica que todas as técnicas PCR-diagnóstica resultaram negativas em 85 amostras, positivas em 19, enquanto que em 20 os resultados foram discordantes.

Tabela 57. Resultados obtidos nas amostras de liquor de acordo com o tipo de técnica PCR-diagnóstica utilizada

		PCR <i>polA</i> -vo	PCR <i>polA</i> +vo
PCR-M -vo	PCR 47-vo	85	2
	PCR-47 +vo	8	9
PCR-M +vo	PCR 47 +vo	1	19

Com o objectivo de melhor se compreender estes resultados, efectuou-se a sua análise (Tabela 58, 59 e 60), relacionando-os com os resultados obtidos nos outros parâmetros estudados no liquor, como o exame citoquímico e os testes de pesquisa de anticorpos específicos e inespecíficos para infecção por *T. pallidum*.

Em relação às 85 amostras com todas as técnicas de PCR-diagnóstica negativas (Tabela 58), em 58/85 (68,2%) todos os outros parâmetros de diagnóstico de neurosífilis foram também negativos. Em 12, o exame citoquímico apresentou-se alterado, verificando-se que em seis os testes treponémicos eram reactivos, sendo apenas num deles, os testes não treponémicos reactivos. Nas restantes 6/13 todos os testes serológicos foram negativos, excepto o TPHA para três amostras.

Tabela 58. Resultados obtidos nos testes serológicos e exame citoquímico das amostras de liquor em que todas as técnicas de PCR-diagnóstica foram negativas

			Exame citoquímico	
			Sem alterações	Com alterações
FTA-Abs -vo	TPHA -vo	TNT* -vos	58	3
	TPHA +vo	TNT – vos	8	3
FTA-Abs +vo	TPHA +vo	TNT -vos	5	5
		TNT +vos	1	1
FTA-Abs duv*.	TPHA +vo	TNT +vos	1	0

* TNT – Testes não treponémicos, duv. – duvidoso

Em 15 amostras o exame citoquímico foi normal, destas duas apresentaram todos os testes serológicos reactivos, em 13 os testes não treponémicos foram negativos, com TPHA reactivo em todas, enquanto que o FTA-Abs o foi apenas em cinco.

Das 19 amostras de liquor com todos os testes PCR-diagnóstica positivos

discriminados na Tabela 59, quatro apresentavam exame citoquímico normal, dos quais apenas numa se observou alteração nos testes treponémicos, enquanto que nas 15 com aumento no número de células, 12 apresentaram também testes serológicos reactivos excepto uma em relação ao TPHA, e noutras duas os teste não treponémico foram negativos, uma delas com os testes treponémicos reactivos sendo o FTA-Abs duvidoso noutra.

Tabela 59. Resultados obtidos nos testes serológicos e exame citoquímico das amostras de liquor em que todas as técnicas de PCR-diagnóstica foram positivas

			Exame citoquímico	
			Sem alterações	Sem alterações
FTA-Abs -vo	TPHA -vo	TNT* -vos	3	1
	TPHA -vo	TNT +vos	0	1
FTA-Abs +vo	TPHA +vo	TNT -vos	1	1
		TNT +vos	0	11
FTA-Abs duv*.	TPHA +vo	TNT -vos	0	1

* TNT – Testes não treponémicos, duv. - duvidoso

Nas 20 amostras em que os resultados obtidos com as técnicas de PCR-diagnóstica foram discrepantes (Tabela 60), a PCR-47 foi positiva em 18 amostras seguida da PCR-*polA* em 11 e a PCR-M numa.

Com as técnicas PCR-47 e PCR-*polA* obtiveram-se mais 10 amostras positivas do que quando apenas uma das técnicas foi realizada individualmente. As técnicas de PCR foram todas positivas em todos os casos de neurosífilis sintomática (nove), com excepção da PCR-M que foi negativa em dois casos.

Tabela 60. Discriminação dos resultados discordantes obtidos nas amostras de liquor , com as técnicas PCR-diagnóstica

		PCR-47	
		Negativo	Positivo
PCR-M -vo	PCR <i>polA</i> -vo	0	8
	PCR <i>polA</i> +vo	2	9
PCR-M +vo	PCR <i>polA</i> -vo	0	1

Relativamente às oito amostras com positividade apenas pela técnica de PCR-47, verificou-se que em sete o exame citoquímico foi normal, estando em cinco destas os restantes parâmetros também normais, enquanto que nas outras duas apenas os testes treponémicos foram reactivos. Na restante amostra, das oito em que apenas a técnica de PCR-47 foi positiva, observou-se alteração no exame citoquímico, sendo os testes não treponémicos reactivos. Em duas amostras apenas a técnica de PCR-*polA* foi positiva, uma com os restantes parâmetros negativos e a outra apenas alterações no exame citoquímico.

As técnicas de PCR-47 e PCR-M, foram positivas simultaneamente numa amostra que apresentou exame citoquímico normal e todos testes serológicos reactivos. Nove amostras foram positivas em simultâneo com as técnicas PCR-47 e PCR-*polA*, sendo o exame citoquímico normal em três, uma com todos os testes alterados e duas apenas com os testes treponémicos. Nas seis com alterações no exame citoquímico, três apresentavam todos os outros testes serológicos reactivos, uma apenas os testes específicos, outra unicamente o TPHA e na última não houve reactividade em nenhum dos testes.

3.3. Subtipagem de *Treponema pallidum*

3.3.1. Análise do gene *tpr* por “nested PCR – RFLP”

Para a obtenção das melhores condições de amplificação de um fragmento do gene *tpr* pela técnica de “nested-PCR” e estudo com a técnica de RFLP do produto resultante, utilizou-se o ADN extraído de *T. pallidum*, obtido a partir de coelhos inoculados e já anteriormente referido, como controlo positivo (CP).

A amplificação do gene *tpr* de *T. pallidum*, estirpe de Nichols, utilizando-se as sequências iniciadoras B1/A2, resulta na produção de um fragmento de ADN de 2186 pb. Os melhores resultados foram obtidos com as seguintes condições: concentrações de 6,25 μ M para as sequências iniciadoras e 3 mM para o $MgCl_2$, temperatura de ligação de 59° C, durante dois minutos, por 35 ciclos.

Na Figura 23 mostra-se a fotografia de um gel de agarose a 1,5 %, onde foi efectuada a electroforese dos produtos de amplificação do ADN de *T. pallidum*, com as sequências iniciadoras B1/A2, as condições referidas no parágrafo anterior e variações apenas na temperatura de ligação. Com esta metodologia observou-se a produção de uma banda correspondente a um fragmento do gene *tpr* da dimensão esperada para as sequências iniciadoras utilizadas, sendo mais visível quando na amplificação PCR se utilizou temperatura de ligação de 59°C.



Figura 23. Optimização da primeira amplificação da técnica de “nested-PCR” do gene *tpr*.

1 – CN; 2 e 3 – CP amplificação com temperatura de ligação de 59° C; 4 e 5 – CP amplificação com temperatura de ligação de 60° C; 6 e 7 – CP amplificação com temperatura de ligação de 62° C.

Para a segunda amplificação da técnica de “nested-PCR” utilizaram-se as sequências iniciadoras IP6/IP7, as quais deram origem a um fragmento 1836 pb, quando amplificado ADN de *T. pallidum*, estirpe de Nichols. As melhores condições para esta amplificação foram obtidas com as concentrações de 6,25 µM para as sequências iniciadoras e de 3mM para o MgCl₂, com uma temperatura de ligação de 60° C, durante um minuto e quarenta ciclos, seguidos de uma extensão final de dez minutos a 72°C.

A fotografia da Figura 24 foi efectuada a um gel de agarose a 1,5 %, após a electroforese dos produtos de amplificação dos controlos negativo e positivo, submetidos a “nested-PCR” com as condições optimizadas e variações na temperatura de ligação da segunda amplificação, e na quantidade de produto da primeira amplificação de 5 µl e 2,5 µl. Deste modo obteve-se um fragmento da dimensão esperada a partir de 5 µl do ADN obtido na primeira amplificação, quando utilizado o controlo positivo com melhor produção quando a temperatura de ligação utilizada foi de 60°C.

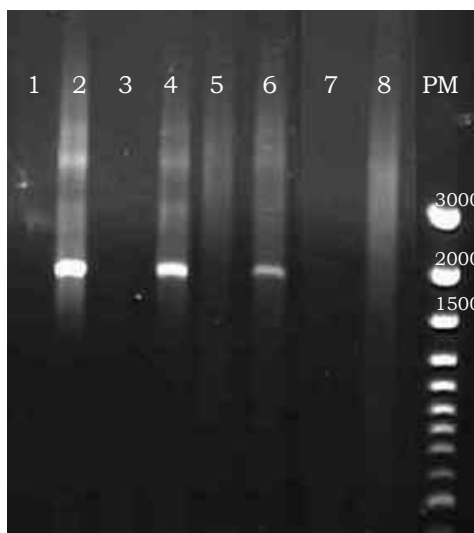


Figura 24. Optimização da segunda amplificação da técnica de “Nested-PCR” para o gene *tpo*. 1 e 5 – CN com 5 µl do produto da primeira amplificação do CN; 3 e 7 – CN com 2,5 µl do produto da primeira amplificação do CN; 2 e 6 – CP com 5 µl do produto da primeira amplificação do ADN do CP; 4 e 8 – CP com 2,5 µl do produto da primeira amplificação do ADN do CP. Variação na temperatura de ligação de 60° C (1 a 5) e 58° C (6 a 8).

Após a segunda amplificação do ADN do controlo positivo, utilizaram-se 6 µl do produto amplificado para análise de restrição com a enzima *Mse* I, tendo-se obtido a produção do padrão de RFLP exemplificado na Figura 25, e que

compreende a presença de fragmentos de ADN com 911, 722, 524, 425 e 382 pb, correspondente ao subtipo *a* de Pillay *et al.* (1998).

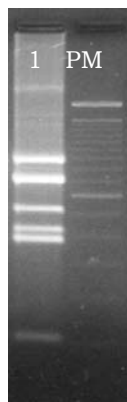


Figura 25. Padrão de RFLP obtido com a enzima de restrição *MseI* aplicada ao produto de nested-PCR do ADN de *T. pallidum* (1).

3.3.2. Análise do gene *arp* por técnica de amplificação

O gene *arp* contém uma região com uma sequência de 60 pb, a qual apresenta um número variável de repetições. A amplificação desta região do ADN de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* (Nichols) com as sequências iniciadoras ARP1/ARP2 leva à produção de um fragmento com 1155 pb, correspondendo a 14 repetições dessa sequência.

As melhores condições de amplificação foram obtidas pela utilização das concentrações de 6,25 μ M para as sequências iniciadoras e de 2 mM para o $MgCl_2$, com uma temperatura de ligação de 61°C, durante um minuto, por 45 ciclos. Os resultados da optimização efectuada podem ser observados na Figura 26, correspondente à fotografia de um gel de agarose de 1,5 %, efectuada para visualizar os produtos de amplificação de ADN do controlo positivo, com as sequências iniciadoras ARP1/ARP2, e variações na concentração de $MgCl_2$ (2mM a 3,5mM) e temperaturas de ligação de 60°C e 58°C. Se bem que se tenha obtido produto da dimensão esperada com as diferentes condições testadas a produção foi melhorada quando se utilizou a concentração de 2mM de $MgCl_2$ e temperatura de ligação de 60°C.



Figura 26. Optimização da amplificação por PCR de um fragmento do gene *arp* com a utilização do ADN de *T. pallidum* com as temperaturas de ligação de 60  C (1 a 5) e de 58  C (6 a 9) e com variações na concentração de MgCl₂ de 2 mM (2 e 6), 2,5 mM (3 e 7), 3 mM (4 e 8) e 3,5mM (5 e 9).

3.4. Subtipagem de *Treponema pallidum* em amostras clínicas

A técnica de subtipagem otimizada foi em seguida aplicada ao estudo de ADN de *T. pallidum* obtido nas amostras clínicas. Foram estudadas 119 amostras, tendo-se conseguido determinar o subtipo em 10/26 (38,5%) amostras de sangue, 12/26 (46,2%) de plasma, 3/26 (11,5%) de soro, 13/22 (59,1%) de exsudado de biopsia de lóbulo de orelha e 0/13 (0%) de liquor. As amostras de exsudado de úlcera genital e de lesões de secundarismo positivas pela técnica de PCR-diagnóstica, foram todas 6/6 (100%) tipadas.

A amplificação do gene *tpr* das diferentes amostras clínicas, utilizando a técnica de “nested-PCR”, anteriormente otimizada para as sequências iniciadoras B1/A2 e IP6/IP7 foi seguida de clivagem dos produtos obtidos pela enzima *Mse* I, tendo-se obtido os padrões de restrição, a, c, f, g e n, de acordo com Pillay *et al.* (1998).

Por outro lado, a amplificação do gene *arp* pela técnica de PCR otimizada para as sequências iniciadoras ARP1/ARP2, resultou em três subtipos, isto é, 10, 11 e 14, com base no número de repetições (Pillay *et al.* 1998).

Os resultados de tipagem obtidos encontram-se esquematizados na Tabela 61, tendo sido possível efectuar tipagem de ADN de *T. pallidum* extraído de amostras de sangue total, de plasma, de soro, de exsudado de biopsia de lóbulo

de orelha e de exsudados de úlceras genitais e lesões de secundarismo. Sempre que a amplificação foi possível, todas as amostras do mesmo doente apresentaram o mesmo subtipo.

Os subtipos encontrados foram o 10a, 14a, 14c, 14f e 14g, havendo duas amostras, uma subtipo 11 *arp*, em que não foi possível discriminar o subtipo *tpr* e outra subtipo *tpr* (n) em que o inverso foi verdadeiro. O subtipo mais frequente foi o 14c sendo o subtipo 10a o menos frequente. Todas as amostras de exsudados de úlceras genitais e de lesões positivas foram tipadas. As amostras, com maior número de colheitas tipadas foram as de exsudados de biopsia de lóbulo de orelha (13/22), seguindo-se as de plasma (12/26), sangue (10/10) e por último as de soro (3/10) de acordo com a taxa de êxito da PCR-diagnóstica.

Tabela 61. Resultados obtidos na subtipagem de *T. pallidum* de amostras sangue, plasma, soro e de exsudados de biopsia de lóbulo de orelha e de lesões

Subtipo	Tipo de Amostras				
	Sangue	Plasma	Soro	Exs. lob. orelha*	Lesões/úlceras
10a	2	-	-	3	-
11	-	1	-	-	-
14a	3	3	1	2	1
14c	3	3	1	3	3
14f	1	3	-	3	1
14g	1	2	-	2	1
n	-	-	1	-	-

* Exs. lób. orelha – exsudado de biopsia de lóbulo de orelha

4. Discussão e conclusões

O isolamento de *T. pallidum* nos líquidos ou em tecidos de um indivíduo com suspeita de infecção seria a melhor estratégia para o diagnóstico da mesma, já que permitiria evidenciar inequivocamente a presença de infecção activa. No entanto, esta estratégia é dificultada pela incapacidade de isolamento de *T. pallidum* em meios de cultura artificiais e pelas limitações dos métodos convencionais na detecção directa de treponemas patogénicos nas amostras clínicas (Turner *et al.* 1969, Tratmont 1990). Por isso, as decisões dos clínicos baseiam-se, com frequência nos resultados obtidos com os testes serológicos, apesar de nem sempre estarem relacionados com a actividade de infecção (Srinivasan *et al.* 1983, Hart 1986)

Devido à sua grande sensibilidade e especificidade, a técnica de PCR tem sido cada vez mais utilizada no diagnóstico das doenças infecciosas, sendo sobretudo útil quando estão em causa microrganismos não cultiváveis em meios artificiais. Para maximizar a eficiência da técnica de PCR é necessária a optimização cuidadosa dos diferentes parâmetros da reacção (Innis e Gelfand 1990). Neste estudo tal foi efectuado, utilizando um controlo positivo constituído por ADN extraído de uma suspensão de *T. pallidum*, estirpe de Nichols, obtida de coelho inoculado com o mesmo, pela técnica descrita no capítulo 2 deste trabalho.

Quando se pretende utilizar uma técnica deste tipo, antes da amplificação, é necessário o tratamento das amostras para obtenção de ADN separado de proteínas, lípidos, açúcares e partículas celulares, removendo-se também todas as substâncias que possam inibir a reacção de amplificação (Barbeyrac 1996).

Assim, efectuou-se o isolamento do ADN total, quer dos controlos quer das amostras clínicas, usando-se o kit comercial “minikit-Qiamp” da Quiagen, seguindo-se o protocolo do mesmo com algumas modificações, a fim de aumentar a eficácia da técnica. Estas consistiram no aumento do volume de proteinase K e do tempo de incubação na fase inicial da extracção, quando se utilizaram amostras de sangue total, assim como num aumento do número de lavagens das colunas com os tampões de lavagem, para eliminação do excesso de proteínas e sais. Por outro lado, para todas as amostras extraídas, com

excepção do sangue, após a etapa inicial de incubação a 56°C com a proteinase K e antes da adição do etanol, foram adicionados 3 µl de ADN de timo de vitela a 10 mg/ml à mistura com o objectivo de servir de veículo de precipitação.

Em todas as amostras extraídas e antes da etapa de eluição foi incluída uma centrifugação suplementar, com a finalidade de remover o tampão de lavagem AW residual. Este tampão contém etanol, inibidor da técnica de PCR, pelo que além desta centrifugação suplementar também se efectuou um passo de limpeza de todos os resíduos com uma ponta de pipeta estéril.

Embora o princípio da técnica de PCR seja constante, as condições experimentais podem variar, pelo que se torna necessária a optimização de alguns parâmetros, como a composição da mistura de reacção e os parâmetros físicos dos ciclos de amplificação. Com base em estudos efectuados por outros investigadores e com a experiência adquirida no estágio no CDC de Atlanta, optimizou-se a técnica de PCR-diagnóstica no laboratório de DST do IHMT. As técnicas de PCR-diagnóstica montadas e optimizadas tiveram como genes alvo de amplificação o gene *TpN* 47 da lipoproteína de 47 kDa (PCR-47) e o gene da enzima ADN polimerase I *polA* (PCR-*polA*).

No que se refere à lipoproteína de 47 kDa ela constitui o antigénio de *T. pallidum* mais proeminente, tendo a sequenciação do seu ADN sido efectuada por Hsu *et al.* (1989). Diversos autores efectuaram estudos que sustentam a especificidade desta lipoproteína e do seu gene correspondente (Marchitto *et al.* 1984, 1986, Hook *et al.* 1985, Norgard *et al.* 1986, Radolf *et al.* 1988, Burstain *et al.* 1991), que foi utilizado em diferentes ensaios de PCR (Burstain *et al.* 1991, Grimpel *et al.* 1991, Sanchez *et al.* 1993, Orle *et al.* 1996, Centurion-Lara *et al.* 1997). Muitos deles utilizam hibridação dos produtos de amplificação, com uma sonda de oligonucleótidos específica de *T. pallidum*, com o objectivo de aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica.

Relativamente ao gene *polA* da enzima ADN polimerase I a descrição a sua sequência foi descrita por Rodes *et al.* (2000), tendo Liu *et al.* (2001) desenvolvido uma técnica de PCR que o utiliza como alvo de amplificação. Estes autores desenharam sequências iniciadoras de modo a seleccionar uma região característica de *T. pallidum* possuidora de 24 resíduos de cisteína, tendo demonstrado que a técnica era bastante sensível e específica, quando utilizada

para amplificação de ADN extraído de amostras de úlceras genitais e de estirpes padrão de outros microrganismos (Rodes *et al.* 2000, Liu *et al.* 2001, Orton *et al.* 2002).

No presente estudo efectuou-se a optimização de uma técnica de PCR-diagnóstica utilizando sequências iniciadoras, que amplificam um fragmento destes dois genes alvo, já descritas por outros autores (Orle *et al.* 1996, Liu *et al.* 2001) e cuja sensibilidade está longe de ser óptima, sobretudo em amostras de sangue. Também, dois pares de sequências iniciadoras foram testadas, para os mesmos genes desenhadas no âmbito deste estudo no programa “Primer Express”, com o objectivo de obter maior sensibilidade.

Os vários componentes da mistura da reacção de PCR como sejam a concentração de magnésio, a concentração das sequências iniciadoras e o tipo de enzima ADN polimerase, podem influenciar a eficácia final da técnica. Assim, para cada uma das sequências iniciadoras variaram-se estes parâmetros, de modo a encontrarem-se condições óptimas de amplificação.

Dois tipos de enzima ADN polimerase, foram experimentadas, uma Taq ADN polimerase e uma enzima ADN polimerase activável a temperatura elevada. Os resultados com qualquer uma destas enzimas foram satisfatórios, quando da amplificação com as sequências iniciadoras KO4A/KO3 e 47-F/47-R, mas o mesmo não se verificou com as sequências iniciadoras ensaiadas para o gene *polA*. Neste caso, a utilização da Taq ADN polimerase levou à produção de grande número de bandas inespecíficas, as quais diminuíram ou desapareceram com a utilização da “Immolase”, pelo que se passou a utilizar esta enzima nos estudos subsequentes. A “Immolase” é uma enzima termoestável que permanece inactiva até que exista um aquecimento a 95°C, resultando num efeito “hot start” (Zangerberg *et al.* 1999). A esta temperatura não há formação de “primer-dimer”, os quais podem competir com a amplificação do produto específico. A utilização da enzima “Immolase” permitiu a eliminação da maior parte das bandas inespecíficas que se obtinham com a utilização com da Taq polimerase na amplificação do gene *polA*, aumentando assim a especificidade da técnica.

O magnésio é um catião que ligando-se à polimerase constitui um cofactor para a actividade da mesma, pelo que a concentração do $MgCl_2$ influencia parâmetros

como a temperatura de ligação, a temperatura de dissociação das cadeias de ADN a amplificar ou dos produtos amplificados, a formação de produtos inespecíficos e a actividade da enzima, sendo por isso importante titular a concentração ideal para cada tipo de reacção. Isto foi efectuado para cada tipo de PCR-diagnóstica montada, tendo-se associado variações na concentração de cada uma das sequências iniciadoras a variações na concentração de MgCl₂.

Cada ciclo de amplificação consistiu em três passos com diferentes temperaturas e tempos distintos. No primeiro passo pretendeu-se a desnaturação do ADN de modo a permitir a hibridização das sequências iniciadoras às suas sequências complementares, tendo sido utilizada a temperatura de 94°C, que se encontra dentro dos valores aconselhados (Saiki 1989). A temperatura do passo seguinte, referente à ligação, foi calculada com base na composição de bases das sequências iniciadoras e em seguida efectuadas variações empíricas, de modo a encontrar a mais apropriada. Verificou-se serem de 57°C para as sequências iniciadoras desenhadas no programa “Primer Express” e de 62°C para as outras. O último passo do ciclo refere-se à extensão, durante a qual a polimerase replica a região alvo. Utilizou-se a temperatura de 72°C, tradicionalmente recomendada para essa actividade. O número de ciclos influencia a quantidade de produto formado e consequentemente a sensibilidade da técnica. Efectuaram-se experiências com números diferentes de ciclos, de 30 a 45, de modo a obter-se um equilíbrio entre o produto formado e a presença de inespecificidades, sendo estes de 35 para as sequências iniciadoras 47-F/47-R e *polA*-F/*polA*-R (PE), de 40 para o par KO3A/KO4 e de 45 para o par *polA*-F/*polA*-R.

A optimização da técnica de PCR-diagnóstica foi realizada recorrendo-se ao ADN de uma estirpe de referência (controlo positivo). As condições óptimas assim estabelecidas foram aplicadas para amplificação do ADN extraído de diferentes tipos de amostras clínicas. No referente à amplificação de um fragmento do gene *TpN47* ela foi possível com os dois tipos de sequências iniciadoras, se bem que com uma menor sensibilidade em relação ao ADN extraído de amostras de sangue, plasma ou soro. Em relação à amplificação de um fragmento do gene *polA* este foi obtido com as sequências iniciadoras *polA*-F/*polA*-R para os vários tipos de amostras, enquanto que a amplificação das mesmas com o par *polA*-

F/*polA*-R (PE) foi fraca ou mesmo nula. Como as sequências iniciadoras descritas por Liu *et al.* (2001) apresentaram boa sensibilidade, não se tornou necessária a pesquisa de um novo par, utilizando-se este nos estudos posteriores.

A técnica de PCR multiplex foi pela primeira vez descrita por Chamberlain *et al.* (1988), para a detecção de mutações do gene da distrofina, sendo o mesmo método aplicado em muitas outras áreas de estudo de ADN (Shuber *et al.* 1993, Henegariu *et al.* 1994, Orle *et al.* 1996, Beyrer *et al.* 1998, Bruisten *et al.* 2001). Uma vez que uma técnica deste tipo tornaria o estudo mais específico e sensível, de execução mais rápida e com menores custos, foi tentado o desenvolvimento de um método PCR-multiplex (PCR-M), com os dois pares de sequências iniciadoras para os genes *polA* e *TpN*-47 na mesma mistura de reacção de PCR. Também neste caso os vários reagentes a utilizar e as condições dos ciclos influenciaram a amplificação. Com base nas condições obtidas com as sequências iniciadoras isoladas, efectuou-se a associação das mesmas, tendo-se variado as suas concentrações, de modo a determinar qual a melhor nestas condições.

O principal desafio no desenvolvimento de uma técnica de PCR-M é o de evitar a formação de “primer-dimer”, sendo aconselhado utilizar um sistema “hot start” (Zangerberg 1999), razão pela qual, na montagem e desenvolvimento desta técnica, apenas se utilizou a enzima “Immolase”, tanto mais que foi esta a enzima com a qual se obtiveram os melhores resultados na PCR-47 e PCR-*polA*. Uma vez mais, as melhores condições a utilizar foram estudadas para o controlo positivo, tendo-se conseguido resultados aceitáveis com as associações das sequências iniciadoras KO3A/KO4 mais *polA*-F/*polA*-R e 47-F/47-R mais *polA*-F/*polA*-R. Contudo, a aplicação das condições optimizadas ao estudo do ADN das amostras clínicas resultou melhor para a associação das sequências iniciadoras KO3A/KO4 e *polA*-F/*polA*-R do que para a associação das sequências iniciadoras 47-F/47-R e *polA*-F/*polA*-R, provavelmente porque estas apresentavam temperaturas óptimas de ligação bastante diferentes, sendo de 57°C para 47-F/47-R e de 62°C para *polA*-F/*polA*-R.

O estudo pela técnica de PCR-diagnóstica, de diferentes tipos de amostras clínicas de doentes com suspeita de sífilis, foi efectuado utilizando as

sequências iniciadoras KO3A/KO4 e *polA-F/polA-R* isoladamente e associadas na mesma mistura de reacção, com base nas melhores condições obtidas quando da optimização das técnicas e nos resultados preliminares dos diferentes tipos de amostras.

Em cada doente estudaram-se sangue total com EDTA, do qual se obteve plasma, sangue total coagulado para obtenção de soro e liquor, sendo este último colhido quando era necessário excluir diagnóstico de neurosífilis. Quando possível, foi colhido exsudado de biopsia do lóbulo da orelha, de modo semelhante ao praticado para o diagnóstico de lepra, tendo como pressuposto que o sangue e o liquor podem conter baixa concentração de treponemas (Turner *et al.* 1969, Tramont 1990). Como *T. pallidum* apresenta um marcado tropismo para as arteríolas (Tramont 1995b), tem-se postulado que tal como no caso de *Borrellia* sp, aquele poderia “ocultar-se” a nível dos vasos capilares nas fases assintomáticas. Como o lóbulo de orelha é uma região rica em vasos sanguíneos capilares, pobre em terminações nervosas e de fácil acesso, poderia tornar-se um bom local de colheita. Assim pretendia-se verificar qual o tipo de amostra mais útil para aplicação em estudos posteriores.

Como supracitado, as técnicas de PCR experimentadas nesta tese tiveram como base as efectuadas por Orle *et al.* (1996) e Liu *et al.* (2001). Estes investigadores utilizaram-nas para amplificação de ADN de *T. pallidum* a partir de ADN extraído de amostras clínicas de exsudado de úlceras genitais. Ao compararem a técnica de PCR com a da microscopia de fundo escuro (MFE) Orle *et al.* (1996) obtiveram sensibilidade de detecção de 91% pelo método PCR e de 81% pela MFE. Por outro lado, Liu *et al.* (2001) obtiveram sensibilidade de 95,8% e especificidade de 95,7% quando compararam a técnica por eles efectuada com a de Orle *et al.* (1996) no estudo de amostras de úlceras genitais. Por outro lado, Marfin *et al.* (2001), ao utilizarem a técnica de Liu *et al.* (2001) no estudo de amostras de sangue de indivíduos com sífilis ou que tinham tido contacto com doentes com sífilis infecciosa, obtiveram amplificação de produto específico em 40%.

Os resultados obtidos com as várias técnicas e tendo em conta o grupo de doentes com sífilis activa (Grupo I), parecem indicar que a técnica de PCR-47 é a que apresenta maior percentagem de casos positivos em todos os tipos de

amostras, seguida da PCR-*polA* e da PCR-M, excepto nos exsudados de lesões, em que os resultados das várias técnicas foram iguais. Apesar de não existirem trabalhos de comparação das técnicas executadas, os resultados obtidos no sangue e pela técnica de PCR-*polA* (34,1%) foram inferiores aos 46,6% (13/28) obtidos por Marfin *et al.* (2001), mas superiores aos 36,5% (15/41) obtidos por Sutton *et al.* (2001) nas amostras de sangue de um grupo de doentes com as características do Grupo I do presente estudo. Contudo, com a técnica de PCR-47, obteve-se uma percentagem maior de amostras positivas no sangue (45,1%).

Por outro lado, a utilização em exclusivo do método de PCR-47, identificou 97% (64/66) dos casos positivos obtidos com todas as técnicas de biologia molecular aqui utilizadas. A técnica de PCR-*polA* identificou 86,4% (57/66) e a PCR-M 72,7% (48/66), pelo que dependendo das circunstâncias, a técnica PCR-47 poderá ser utilizada como técnica única ou em conjunto com a PCR-*polA*, uma vez que esta foi positiva em mais duas amostras e a PCR-47 em sete, enquanto que a técnica de PCR-M nunca foi positiva, isoladamente.

No que diz respeito ao tipo de amostra e a cada uma das técnicas testadas, verificou-se que com a utilização das amostras de exsudado de biopsia do lóbulo de orelha e de plasma se identificaram todos os casos positivos, quando utilizada a técnica de PCR-47, não se identificando apenas um caso para cada uma, quando utilizadas as técnicas PCR-*polA* e PCR-M. Se bem que o número de casos apresentado seja pequeno, parece recomendável a utilização destes dois tipos de amostras, sobretudo quando não existem lesões, uma vez que parecem ser as melhores amostras para a execução da técnica de PCR. Todos os exsudados de úlceras genitais de doentes com diagnóstico de sífilis primária foram positivos pelos métodos de PCR, tendo havido um caso de úlcera genital clinicamente correspondente a sífilis primária com microscopia de fundo escuro positiva que foi negativo em todos os testes serológicos e positivo por todas as técnicas de PCR, assim como em todos os outros tipos de amostras (sangue, plasma e exsudado de biopsia do lóbulo de orelha). Jethwa *et al.* (1995) efectuaram a comparação de uma técnica de PCR com a técnica de imunofluorescência directa em úlceras genitais, tendo encontrado uma taxa de concordância de 95,5%. Por outro lado, outros investigadores (Morse *et al.* 1997, Mertz *et al.* 1998, Beyer *et al.* 1998, Behets *et al.* 1999, Bruisten *et al.*

2001, Palmer *et al.* 2003) efectuaram pesquisa de ADN de *T. pallidum* em úlceras genitais, utilizando uma técnica de PCR multiplex para pesquisa simultânea dos três agentes mais frequentes de úlceras genitais (vírus herpes simplex, *T. pallidum* e *H. ducreyi*) e verificaram que esta técnica era mais eficaz para o diagnóstico de infecção sífilítica do que as classicamente utilizadas. Bruisten *et al.* (2001) encontraram positividade de 3,3% na pesquisa de ADN de *T. pallidum* na totalidade das amostras de úlceras genitais que estudaram, e de 1,9% quando nos mesmos indivíduos efectuaram diagnóstico de sífilis activa pela utilização dos testes serológicos. Behets *et al.* (1999), ao compararem a técnica de PCR (em úlceras genitais) com a serologia para o diagnóstico de sífilis primária, encontraram sensibilidade de 72% e especificidade de 83%, sendo as mesmas de 53% e de 52% quando a comparação foi efectuada com o diagnóstico clínico, tendo como base a história clínica do doente e o exame objectivo. Por outro lado, também Palmer *et al.* (2003) num estudo efectuado de pesquisa de ADN de *T. pallidum*, por técnica de PCR, a partir de zaragatoas de úlceras (anogenitais e orais), encontraram sensibilidades de 94,7% e 80,0% para sífilis primária e sífilis secundária, respectivamente.

No referente aos exsudados de lesões cutâneas de indivíduos com sífilis secundária incluídos neste estudo, só foi possível analisar um pequeníssimo número de amostras, pelo que se torna difícil extrair conclusões, embora seja conhecido que este tipo de lesões deverá conter grande número de treponemas (Tratmont 1995b, Larsen *et al.* 1998, Musher 1999). Amostras de lesões cutâneas e mucosas de três doentes com sífilis secundária foram estudadas, verificando-se que em dois casos todas as amostras de lesões e de colheitas sistémicas foram positivas por todas as técnicas de PCR-diagnóstica efectuadas. No terceiro doente com sífilis secundária, a amostra de lesão cutânea (lesão não exsudativa) e a de sangue total foram negativas, enquanto que se observou positividade no plasma e no soro (neste doente não foi efectuada colheita por biopsia). Estes resultados parecem indicar que as técnicas de biologia molecular utilizadas no estudo parecem ser sensíveis para o diagnóstico de sífilis secundária a partir de lesões cutâneas, desde que estas estejam na fase húmida e não escamosa, quando provavelmente os treponemas podem não estar presentes no local.

Os resultados obtidos com as técnicas de PCR-diagnóstica no grupo de doentes sem sífilis actual (Grupo II - indivíduos tratados para sífilis e/ou com serologia para sífilis negativa) parecem indicar que estas técnicas têm boa especificidade, tendo sido negativas nos indivíduos que não apresentavam infecção, ou que a tendo adquirido, tinham efectuado terapêutica específica, com excepção de um caso, para cada uma destas possibilidades. Um doente tinha efectuado terapêutica e outro tinha serologia para sífilis negativa, tendo neste a técnica de PCR sido negativa na amostra de soro e positiva nas amostras de sangue total e plasma. Este era o caso de um indivíduo com contacto de risco com um doente com infecção a *T. pallidum*, que não apresentava qualquer sintomatologia e que provavelmente se encontrava em período de incubação, uma vez que mais tarde apresentou reactividade nos testes serológicos. Embora reportando-se apenas a um caso, este resultado é interessante, já que coloca a hipótese da técnica poder vir a ser utilizada para o rastreio de indivíduos com contactos de risco, permitindo o diagnóstico em fase de incubação. O mesmo tinha já sido verificado por Marfin *et al.* (2001) que obtiveram percentagem de 25% de positividade nos (oito) doentes em período de incubação que estudaram.

Uma boa especificidade do método de PCR foi também encontrada por Orton *et al.* (2002), os quais efectuaram um estudo de prevalência de *T. pallidum* em dadores de sangue, utilizando os mesmos genes alvos de amplificação do presente estudo e uma técnica de RT-PCR (transcriptase reversa-PCR). Em estudos anteriores, recorrendo a amostras de indivíduos com sífilis e de animais infectados experimentalmente (Grimpel *et al.* 1991, Wicher *et al.* 1996, Wicher *et al.* 1998) foi possível determinar a correlação entre a amplificação pela técnica de PCR e o teste de infecciosidade no coelho, tendo ainda sido demonstrado que o ADN de *T. pallidum* desaparece rapidamente. Por outro lado, também Pietravalle *et al.* (1999), ao utilizarem uma técnica de PCR para estudo de amostras de soro de indivíduos em diferentes estádios de sífilis com testes serológicos reactivos que tinham efectuado terapêutica para sífilis e de indivíduos sem sífilis, encontraram uma boa especificidade já que, quer no grupo de seronegativos para infecção a *T. pallidum* quer no dos previamente tratados para esta infecção, a pesquisa por PCR foi negativa.

Também no grupo II foram incluídas amostras de lesões, quatro de úlceras

genitais e três de lesões cutâneas, as quais foram negativas por todas as técnicas PCR-diagnóstica. As amostras de úlceras genitais provieram de indivíduos cujos testes serológicos foram negativos na altura da colheita e que assim se mantiveram na segunda colheita, cerca de três a quatro semanas mais tarde. As amostras de lesões cutâneas foram colhidas em doentes com diagnóstico de sífilis secundária que tinham efectuado terapêutica específica para sífilis antes da colheita. Nestes, as lesões encontravam-se em vias de resolução e todos os outros tipos de amostras (sangue, plasma, soro e exsudado de biopsia de lóbulo de orelha) foram negativas pelas três técnicas de PCR-diagnóstica.

Analizando-se os resultados obtidos relativamente aos diferentes estádios de sífilis, as técnicas de PCR foram mais sensíveis no estadio de sífilis primária e secundária, sobretudo na primária, sendo a sífilis latente o estadio em que a percentagem de positividade encontrada foi mais baixa. Estes resultados estão de acordo com a presença de um maior número de microrganismos naqueles estádios, assim como com a presença precoce de *T. pallidum*, no sangue, o qual dissemina rapidamente após a inoculação, podendo ser encontrado no sangue de indivíduos no período de incubação e de sífilis recente (Tratmont 1995b). A presença de ADN de *T. pallidum* em indivíduos com sífilis latente foi também verificada no trabalho efectuado por Marfin *et al.* (2001). Estes autores estudaram amostras de sangue total de 28 indivíduos com sífilis, tendo amplificado ADN de *T. pallidum* por PCR-*polA* em 13 (46,6%), dos quais 4/8 (50%) se encontravam em período de incubação, 1/7 (14,2%) com diagnóstico de sífilis primária, 1/1 (100%) com sífilis secundária e 7/12 (58,3%) com sífilis latente. No presente estudo e para o mesmo tipo de amostra (sangue total) e técnica de PCR (PCR-*polA*) obtiveram-se as percentagens de 53,3% (8/15), 57,1% (4/7) e 27,6% (16/69) para sífilis primária, secundária e latente respectivamente.

Quanto ao tipo de amostra e relacionando-o com os estádios da sífilis, as amostras mais sensíveis foram sempre as provenientes dos exsudados de biopsia de lóbulo de orelha, seguidas pelas amostras de plasma, sangue total e soro. Se bem que não haja referências a estudos de comparação de diferentes tipos de amostras, outros autores efectuaram pesquisas de ADN de *T. pallidum*

em amostras de sangue, de liquor e de soro (Grimpel *et al.* 1991, Centurion-Lara *et al.* 1997, Pietravalle *et al.* 1999, Marfin *et al.* 2001, Sutton *et al.* 2001), e embora tenham obtido resultados positivos nos indivíduos com doença activa, não compararam os resultados. Assim, e quer em relação ao tipo de PCR-diagnóstica, quer ao tipo de amostra, parece que qualquer que seja o estágio da infecção, a amostra ideal será o exsudado de biopsia do lóbulo de orelha, com a qual se obteve os melhores resultados, em conjunto com a técnica de PCR-47 e se necessário em associação com a PCR-*polA*.

A dificuldade em diagnosticar neurosífilis, sobretudo neurosífilis assintomática, foi mencionada no capítulo 3 deste trabalho, onde ficou evidente a necessidade na associação entre os diversos parâmetros laboratoriais e a clínica, embora muitas vezes continuem a subsistir dúvidas de diagnóstico. O teste de infecciosidade por inoculação de liquor no coelho é considerado como o teste mais sensível para a identificação da neurosífilis (Turner *et al.* 1969, Conde-Sendín *et al.* 2002). Contudo, para a execução deste teste, é essencial a existência de um biotério, sendo ainda necessários, três a seis meses para obtenção de resultados, o que torna o teste impraticável na prática corrente. Assim, uma técnica de PCR específica e sensível poderá ser um teste alternativo rápido para a detecção de *T. pallidum* no liquor, contribuindo para o esclarecimento do diagnóstico. Hay *et al.* (1990a) identificaram ADN de *T. pallidum* no liquor de doentes com sífilis latente tardia e terciária, enquanto que Grimpel *et al.* (1991) obtiveram resultados positivos no líquido amniótico, sangue fetal e no liquor.

No presente trabalho aplicou-se a técnica de PCR-diagnóstica para a detecção de ADN de *T. pallidum* no liquor de um grupo de doentes com sífilis activa, em vários estádios de infecção e num grupo de indivíduos sem infecção por *T. pallidum*, considerado como grupo controlo negativo, para verificar a utilidade daquele método no diagnóstico de neurosífilis.

No estudo das amostras do grupo controlo negativo nenhuma resultou positiva, pelo que as técnicas de PCR-diagnóstica, parecem ter boa especificidade, quando aplicadas a este tipo de amostra. O mesmo não foi observado em estudo efectuado por Hay *et al.* (1990a) que encontraram uma especificidade de 96,6%

(1/30) no estudo de líquidos de um grupo de indivíduos sem infecção a *T. pallidum*.

No estudo das amostras de líquido de indivíduos com sífilis, verificou-se que a técnica com maior número de resultados positivos foi a PCR-47 (29,8%), seguida pela PCR-*polA* (24,2%) e PCR-M (16,1%). Ao considerar-se a totalidade de resultados positivos (39) simultaneamente ou não pelos três métodos, a técnica de PCR-47 identificou todas as amostras positivas com as outras técnicas, com excepção de duas, apenas identificadas pela PCR-*polA*, enquanto que esta técnica identificou menos 10 e a PCR-M menos 17 do que a PCR-47.

Embora seja grande a dificuldade em analisar a sensibilidade e especificidade de qualquer técnica no diagnóstico de neurosífilis, como já mencionado, pela inexistência de um teste padrão, os resultados descritos sugerem que a técnica de PCR-47 pode ser a que apresenta maior sensibilidade. Futuros estudos são necessários para o confirmar.

O relacionamento dos resultados das técnicas de PCR-diagnóstica entre si, permitiu verificar que 85 casos foram negativos e 19 positivos por todas as técnicas, havendo 20 amostras em que os resultados não coincidiram.

Sendo importante um melhor esclarecimento do significado destes resultados efectuou-se a sua análise, comparando-os com os resultados obtidos nos restantes parâmetros utilizados no diagnóstico de neurosífilis (exame citoquímico, testes não treponémicos e testes treponémicos).

Das 85 amostras em que todas as PCR-diagnóstica foram negativas, em 68,2% (58/85) os resultados dos outros parâmetros foram também negativos, considerando-se portanto de verdadeiros casos de negatividade, enquanto que em 27 tal não se verificou. Em 5,8% (5/85) destas, verificou-se terem exame citoquímico alterado, testes treponémicos reactivos e testes não treponémicos negativos, pelo que como aqueles parecem ter uma maior sensibilidade, sobretudo o FTA-Abs, poderão eventualmente ser considerados casos de falsa negatividade pela técnica de PCR. Uma amostra, era sem dúvida de um caso de neurosífilis visto apresentar exame citoquímico anormal assim como todos os testes reactivos. Este líquido era proveniente de um doente com infecção por VIH, e diagnóstico inicial de sífilis latente de duração indeterminada, o qual efectuou terapêutica específica para neurosífilis, tendo-se observado melhoria

no exame citoquímico na monitorização do resultado após a terapêutica. Em outros 6/85 (7,1%) (com diagnóstico inicial de sífilis latente), embora o exame citoquímico se tenha apresentado com alterações, tanto os testes treponémicos, com excepção do TPHA em três casos, como os testes não treponémicos e todas as PCR-diagnóstica foram negativas, pelo que os resultados provavelmente reflectem casos negativos. Ainda neste grupo de líquidos com todas as técnicas PCR-diagnóstica negativas, 15 estavam associadas a um exame citoquímico normal. Em duas destas todos os testes serológicos foram reactivos, pelo que poderiam ser verdadeiros positivos e consequentemente a técnica de PCR-diagnóstica ter resultado falsamente negativa. Noutros cinco líquidos em que os testes treponémicos foram reactivos e os não treponémicos negativos, torna-se difícil tirar ilações no que diz respeito ao diagnóstico de neurosífilis. Nos restantes oito, em que todos os testes, excepto o TPHA foram negativos, assim como a PCR-diagnóstica, deverão tratar-se de verdadeiros negativos, tanto mais que, como já referido na discussão do capítulo 3, o TPHA parece apresentar alguma falsa positividade. Em resumo, as técnicas de PCR-diagnóstica aplicadas ao estudo de líquido originaram no máximo 8/73 (11%) resultados de falsa negatividade, podendo auxiliar no esclarecimento de alguns casos duvidosos, para os quais os resultados dos outros testes não permitem um diagnóstico correcto. De qualquer modo, outros estudos com monitorização adequada dos doentes, poderão esclarecer alguns resultados obtidos nesta tese. Entre as amostras de líquido com todas as técnicas de PCR-diagnóstica positivas (19/124), 11 apresentaram todos os outros parâmetros alterados, correspondendo assim a verdadeiros casos positivos de neurosífilis. No entanto, em 8 amostras de líquido os resultados não foram concordantes. Em relação a estes, quatro apresentaram exame citoquímico alterado, uma proveniente de um doente com sífilis secundária, em que apenas o exame citoquímico apresentou alterações, o que poderá corresponder a invasão do sistema nervoso central por *T. pallidum*, tal como descrito por Lukehart *et al.* (1988). Nas outras três, os testes não treponémicos eram negativos, sendo que em duas os testes treponémicos eram reactivos e apenas numa o FTA-Abs, existindo co-infecção pelo VIH, pelo que poderiam tratar-se de verdadeiros positivos da técnica de PCR. Nas outras quatro amostras de líquido, todas

apresentaram o exame citoquímico normal, uma tinha testes treponémicos reactivos e testes não treponémicos negativos, sendo um caso de neurosífilis sintomática, que melhorou após terapêutica específica. As outras três amostras, pertenciam a doentes com diagnóstico de sífilis latente e nelas todos os outros parâmetros estudados negativos, colocando-se a questão de falsa positividade pelas técnicas de PCR. No seu estudo, Lukehart *et al.* (1988) observaram a presença de *T. pallidum* no liquor de 4/58 indivíduos sem outras alterações, tendo o mesmo sido encontrado por Chung *et al.* (1994) em 4/26, enquanto que no presente estudo esse tipo de resultado se verificou em 3/124 amostras de liquor dos doentes infectados por *T. pallidum*. Estes doentes podem representar indivíduos nos quais se observa invasão do sistema nervoso central sem patologia, ou em que a invasão é recente, não se tendo ainda desenvolvido alterações no liquor, ou ter sido efectuada terapêutica antibiótica por outras razões que não sífilis. Para se conhecer a verdadeira causa desta falta de concordância de resultados seria necessário efectuar a monitorização destes doentes.

Resta descrever 20 amostras nas quais os resultados das técnicas PCR-diagnóstica foram discrepantes, tendo a técnica de PCR-47 sido positiva num maior número de amostras (18/20). Quando associada à técnica de PCR-*polA*, identificaram ADN de *T. pallidum* em mais 10 amostras, enquanto que com a PCR-M não se observou nenhum acréscimo. Os resultados obtidos neste grupo confirmam os anteriores, podendo colocar-se a dúvida sobre se a presença de *T. pallidum* significa infecção, devendo ser tratado como neurosífilis, assim como se a técnica de PCR-47 é muito sensível mas pouco específica. Se em estudos posteriores se comprovar, através da monitorização dos doentes, que estes casos são verdadeiros positivos, a técnica de PCR-47 e/ou a PCR-*polA* poderá permitir a clarificação do diagnóstico em alguns indivíduos, nos quais os resultados obtidos com os outros testes são de difícil interpretação.

Embora conhecida e com terapêutica eficaz desde há longo tempo, a sífilis mantém ainda hoje em dia distribuição mundial e apesar de mais prevalente nos países em desenvolvimento continuam a surgir surtos quer na Europa, quer nos Estados Unidos da América do Norte (Ratcliffe *et al.* 1998, Wheeler *et*

al. 2003, CDC 2003). Se bem que no nosso país aparentemente os dados nacionais de notificação não pareçam alarmantes, sabe-se que se trata de uma infecção que nem sempre é notificada, mas mesmo assim o número de casos relatados de sífilis congénita é alarmante e demonstram que estará presente também nos adultos.

Tal como anteriormente explicado esta infecção mantém a sua importância devido à sua associação com a infecção por VIH (Flemming e Wasserheit 1999), à morbilidade e mortalidade da sífilis congénita (Musher 1999), assim como à relativa frequência em que existe evolução para neurosífilis, sobretudo nos indivíduos infectados pelo VIH (Swartz *et al.* 1999, Marra *et al.* 2000,).

Os estudos epidemiológicos são importantes com vista à prevenção e ao controlo das infecções. Em relação à infecção por *T. pallidum*, os estudos epidemiológicos têm sido sobretudo baseados em dados serológicos, sem informações sobre o agente. No entanto, o conhecimento das suas características, nomeadamente a sua caracterização genética, é essencial para a prossecução destes objectivos.

As técnicas de biologia molecular, como a técnica de PCR (Saiki *et al.* 1988) e o novo sistema de subtipagem molecular das estirpes de *T. pallidum* (Pillay *et al.* 1998) poderão responder a questões importantes sobre a epidemiologia da sífilis, tais como, subtipos de *T. pallidum* prevalentes nas diferentes áreas geográficas, a maior ou menor capacidade de virulência de determinadas estirpes, a sua maior ou menor transmissibilidade, a monitorização da cadeia de transmissão e a possível diferenciação entre falência terapêutica e reinfeção. Para isso, torna-se necessário que a técnica de subtipagem seja sensível e reprodutível.

Tendo em conta o anteriormente referido, efectuou-se a montagem e a optimização da técnica de subtipagem molecular com base no trabalho de Pillay *et al.* (1998). O sistema de tipagem utilizado para a detecção da diversidade de *T. pallidum* (Pillay *et al.* 1998) baseia-se na amplificação por técnica de PCR de um fragmento do gene que codifica a proteína putativa acidica com repetições (*arp*) e no estudo por RFLP de um fragmento amplificado por “nested-PCR” do gene “*Treponema pallidum* repeat” (*tpr*). A optimização das técnicas foi efectuada com o controlo positivo de ADN de *T. pallidum* estirpe de Nichols, efectuando-se

variações nos diferentes parâmetros das técnicas, de modo a obter as melhores condições de amplificação, a serem aplicadas no estudo do ADN de *T. pallidum* extraído das amostras clínicas do presente estudo.

As melhores condições de amplificação obtidas foram ligeiramente diferentes às de Pillay *et al.* (1998), sobretudo no que se refere às temperaturas óptimas de ligação 59°C, 60°C, 61°C, obtidas neste estudo, inferiores às de Pillay *et al.* (1998) de 64°C, 63°C e 62°C, respectivamente, para a primeira e segunda amplificação da “nested-PCR” e para a amplificação do gene *arp*. Muito provavelmente estas alterações resultam de diferenças nos reagentes e termociclador utilizados, sabendo-se que sempre que qualquer uma das condições se modifica, é necessária a optimização das mesmas (Saiki 1989).

A combinação dos dois sistemas de tipagem foi aplicado ao estudo do ADN de *T. pallidum* extraído das diferentes amostras clínicas, tendo a amplificação sido conseguida em todos os tipos de produtos colhidos, com excepção do liquor. Esta situação resultou provavelmente do baixo número de treponemas existentes nestas amostras, conforme se observou pelo baixo nível de amplificação obtida quando as mesmas foram estudadas pelas técnicas de PCR-diagnóstica, ou por degradação do ADN durante o armazenamento, uma vez que mediou algum tempo entre a técnica de PCR-diagnóstica e o estudo para subtipagem, ou ainda da existência de factores inibidores da amplificação. Experiências futuras serão efectuadas encurtando o tempo entre as duas técnicas, o que poderá aumentar a sensibilidade da técnica de subtipagem.

O facto de neste estudo se ter detectado *T. pallidum* em vários tipos de amostras, nomeadamente no sangue, faz com que em futuros estudos se possa incluir a tipagem de amostras de indivíduos com sífilis latente, estender esta análise ao estudo de contactos e seguir a cadeia de transmissão.

Os estudos de tipagem, até agora efectuados, utilizam, principalmente amostras de úlceras genitais (Pillay *et al.* 1998, 2002, Sutton *et al.* 2001), se bem que Marfin *et al.* (2001) e Sutton *et al.* (2001), o tenham experimentado em amostras de sangue total. Marfin *et al.* (2001) estudaram sangue total de 28 indivíduos com sífilis, em diferentes estádios, tendo obtido amplificação pela técnica de PCR-*polA* em 13 e amplificação dos genes *arp* e ou *tpr* em sete destes últimos, enquanto Sutton *et al.* (2001) conseguiram subtipar quatro das 15

amostras de sangue total positivas pela técnica PCR-*polA*. Estes investigadores não utilizaram amostras de exsudado de biopsia de orelha.

No presente estudo foi possível efectuar amplificação dos genes *tpr* e *arp* em 13/22 amostras de exsudado de biopsia de lóbulo de orelha, 10/26 de sangue, 12/26 de plasma, 3/26 de soro e em todas as amostras (6) de exsudado de úlcera genital e lesões de secundarismo. Embora estes números sejam pequenos e tal como para a técnica de PCR-diagnóstica o exsudado de biopsia de lóbulo de orelha e de plasma, parecem ser o tipo de amostra com o qual se obtêm melhores resultados, para além das de exsudado de úlcera ou lesões, considerados os tipo de amostra de eleição. Mais uma vez, estes resultados parecem estar relacionados com a quantidade de treponemas. *T. pallidum* existe em grande número nas amostras de lesões, e provavelmente a nível dos capilares do lóbulo da orelha estes microrganismos são também mais frequentes. Por outro lado, os maus resultados no soro podem dever-se à retenção destes microrganismos no coágulo. Ainda em relação às amostras de lesões deve ser aqui realçada a importância da grande sensibilidade desta técnica, tal como descrito por Pillay *et al.* (1998, 2002) e Sutton *et al.* (2001). Estes investigadores efectuaram subtipagem em amostras de úlceras genitais e sangue total, sendo que as amostras mais sensíveis foram as de úlceras genitais, tal como sucedeu no presente estudo. Sutton *et al.* (2001) subtiparam 100% (41/41) das amostras de úlceras genitais positivas pela técnica de PCR, enquanto que essa percentagem foi de 80,1% (161/201) no estudo de Pillay *et al.* (2002). Em relação às amostras de sangue total apenas os primeiros investigadores o efectuaram, tendo subtipado 26,6% (4/15) das amostras em que tinham conseguido identificar *T. pallidum* por PCR (15/68), percentagem inferior à obtida neste trabalho (38,4%).

Por outro lado, em todas as amostras do mesmo indivíduo que amplificaram, foi identificado o mesmo subtipo de *T. pallidum*, o que demonstra a reprodutibilidade da técnica. Este facto é extremamente importante pois permitirá, principalmente em epidemias de sífilis, identificar os contactos de modo a possibilitar um controlo eficaz da doença. Assim, parece evidente que a técnica de subtipagem precisa de ser melhorada no que diz respeito à sua sensibilidade para que possa ser rentável com vista a ser aplicada em estudos

de epidemiologia.

A aplicação deste sistema permitiu a subtipagem de todas as amostras amplificadas com excepção de duas, uma para o gene *arp* e outra para o gene *tpr*, o que poderá dever-se ao não ligação das sequências iniciadoras de PCR com as sequências de ADN presentes nas amostras ou à quantidade insuficiente do ácido nucleico. O mesmo tipo de dificuldade foi encontrado por Pillay *et al.* (1998, 2002), relativamente ao gene *arp*.

Embora o número de amostras subtipadas seja demasiado pequeno para que se possa concluir relativamente à prevalência de subtipos, foi possível verificar a existência de múltiplos genótipos na população estudada, sendo o 14c o subtipo mais frequente e 10a o menos prevalente. Sutton *et al.* (2001), no estudo de 45 amostras (quatro de sangue e as restantes de úlceras genitais) de doentes da região de Arizona nos Estados Unidos, identificaram dez subtipos, sendo o subtipo 14f o mais frequentemente encontrado. Por outro lado, nos estudos efectuados por Pillay *et al.* (1998 e 2002) e diferentemente dos presentes resultados e dos de Sutton *et al.* (2001), o subtipo mais frequente foi o 14d, o qual dominou nas amostras provenientes de doentes da África do Sul.

Todos os subtipos identificados neste trabalho, com excepção do subtipo 10a, tinham já sido descritos noutros estudos (Pillay *et al.* 1998, 2002, Sutton *et al.* 2001). A confirmar-se a existência deste subtipo apenas em Portugal ou em regiões muito específicas poderá ser o reflexo de diferenças geográficas, uma vez que também no estudo efectuado por Pillay *et al.* (1998) o subtipo 14c foi apenas encontrado em doentes da África do Sul. As diferenças geográficas, por sua vez, sofreriam a influência da proximidade de contactos com outras regiões do globo. No caso do nosso país, o fluxo de populações migrantes entre Portugal e os países africanos de expressão portuguesa, poderia ser um factor muito útil a ter em conta em futuros programas de prevenção e controlo desta doença, se por acaso os subtipos únicos ou mais frequentes em Portugal forem os mesmos desses países.



Capítulo 5. Conclusões gerais e perspectivas futuras

1. Discussão e conclusões finais

Sendo um dos objectivos desta tese a avaliação de testes serológicos no diagnóstico de sífilis e tendo em conta que o VDRL tem sido o teste mais utilizado e recomendado para esse fim, compararam-se os dois testes não treponémicos mais utilizados, o VDRL e o RPR. Os resultados obtidos foram idênticos para os dois testes não treponémicos, tendo o RPR demonstrado ser o mais indicado quando se pretende conhecer o efeito da terapêutica prescrita, num doente em que foi diagnosticada infecção a *T. pallidum*.

A sensibilidade dos dois testes não treponémicos foi semelhante, variando entre 91,9% e 100%, dependendo do estágio da sífilis. Estes resultados estão de acordo com outros autores (Parhamm *et al* 1984, Hambie *et al.* 1983, Larsen *et al.* 1995) que obtiveram uma sensibilidade baixa na infecção primária por *T. pallidum*, embora seja um pouco surpreendente a sensibilidade elevada obtida neste estudo para o estágio de sífilis latente. De qualquer modo, ficou demonstrado que, principalmente, na sífilis primária, existe a necessidade de se desenvolverem novos testes, mais sensíveis, que possam servir de técnica padrão para uma melhor avaliação, sempre que se pretenda conhecer a eficácia de uma técnica no diagnóstico de sífilis.

Também foi verificado que a diminuição do título de anticorpos após a terapêutica, foi mais precoce para as amostras de doentes com sífilis primária, pelo que se devem seguir as recomendações anteriores (WHO 2001, CDC 2002a, Brown *et al.* 2003), nas quais se recomenda que os doentes com sífilis latente tardia ou de duração indeterminada devem ser monitorizados durante mais tempo (24 meses) em relação aos que apresentam estádios mais recentes (12 meses).

Ao estudar a co-infecção VIH/*T. pallidum*, verificou-se que a infecção por *T. pallidum* foi mais frequente nos indivíduos com infecção por VIH. Por sua vez, existiu associação estatisticamente significativa entre aquela infecção viral e o aparecimento de resultados falsamente reactivos nos testes não treponémicos, tendo esta associação, no presente estudo, demonstrado ser independente da

existência de toxicodependência. A infecção por VIH parece pois ser o factor que mais contribui para o aparecimento de resultados de falsa reactividade. Assim, no indivíduo cujo soro apresenta falsa reactividade num teste não treponémico deve ser efectuada pesquisa de anticorpo anti-VIH.

Na avaliação dos testes treponémicos ficou claro que o FTA-Abs é o que primeiro a reactivar após a infecção, tal como referido por outros autores (Larsen *et al.* 1998, Wicher *et al.* 1999) e que os testes treponémicos não devem ser utilizados para monitorizar o resultado da terapêutica, com excepção do TP.PA, que parece apresentar diminuição dos seus títulos após tratamento adequado.

O facto de se terem obtido resultados de falsa negatividade com a técnica de TPHA em indivíduos com sífilis latente, coloca o problema de alguns resultados deverem obrigatoriamente ser confirmados pelo FTA-Abs. Quando se estudou outra técnica treponémica, o TP.PA, verificou-se que é mais sensível que o TPHA, embora menos quando comparado com o FTA-Abs, sendo tão específico como este último. De notar que, ao contrário do TPHA, o teste TP.PA diagnosticou todos os casos de sífilis primária, pelo que parece pode ser utilizado tal como o FTA-Abs, nas fases mais precoces da infecção.

O teste EIA, avaliado neste trabalho, parece ser sensível e específico detectando menos casos de sífilis tratada do que o FTA-Abs, embora não seja um teste que possa ser utilizado na monitorização do resultado da terapêutica. A sensibilidade do teste EIA na sífilis primária foi maior que a do RPR e do TPHA.

O Western blot, por sua vez, parece também ser comparável ao FTA-Abs, embora não reactivo num maior número de amostras de doentes que efectuaram terapêutica.

Em relação ao estudo de anticorpos de tipo IgM específicos, tanto o teste EIA M como o Western blot M parecem ser mais sensíveis que o FTA-Abs M na detecção de IgM nas fases precoces da doença, esclarecendo casos indeterminados desta última técnica. Embora estes anticorpos apareçam mais frequentemente na sífilis recente, existiram neste estudo muitas amostras de doentes neste estágio da doença em que os anticorpos específicos de tipo IgM não foram reactivos, pelo que, não parecem de grande utilidade na diferenciação entre fase recente e tardia.

No presente estudo foi avaliado o significado da reactividade dos testes serológicos e de outras alterações a nível do liquor, tentando compará-los entre si e estudando-os em diversas fases da infecção a *T. pallidum*. Esta decisão deveu-se ao facto sobejamente conhecido de que, se o diagnóstico de sífilis é por vezes difícil, se torna extremamente complicado quando o doente apresenta suspeita de neurosífilis, especialmente quando assintomática. Nesta situação, não existe nenhum teste padrão, uma vez que segundo vários autores um VDRL (Larsen *et al.* 1998; CDC 2002a) reactivo no liquor é muito específico, mas pouco sensível (Sparling 1971, Hooshmond *et al.* 1972, Jaffe e Kabins 1982, Burke e Scaberg 1985). Nos doentes com infecção por VIH a evolução para neurosífilis é frequente e precoce (Johns *et al.* 1987, Flood *et al.* 1992, Berger 1991), pelo que um diagnóstico correcto e atempado é cada vez mais necessário. Nesta parte do estudo foi evidenciado que, quando um indivíduo é não reactivo para pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* no sangue, também o será, a nível do liquor.

De acordo com os resultados obtidos parece claro que o RPR, ao contrário do preconizado por outros autores (Larsen e Johnson 1998), poderá ser utilizado no diagnóstico laboratorial de neurosífilis. Os dois testes diagnosticaram todos os verdadeiros positivos de neurosífilis e todos os verdadeiros negativos nos doentes com sífilis secundária.

Em relação aos testes treponémicos, o TPHA e o TP.PA parecem comportar-se de forma semelhante, sendo os que mais resultados falso reactivos apresentam no diagnóstico de neurosífilis na globalidade. Pelo contrário, o FTA-Abs e o Western blot são os que parecem mais sensíveis na pesquisa de anticorpo anti-*T. pallidum* no liquor. Por outro lado a pesquisa de anticorpos específicos, de tipo IgM, não demonstrou ser útil no diagnóstico de neurosífilis.

No que diz respeito às técnicas de biologia molecular, estudaram-se várias condições duma técnica de PCR que, pudesse vir a ser utilizada no diagnóstico de sífilis nos vários estádios da infecção.

Várias condições e sequências iniciadoras foram avaliadas com base em estudos anteriores (Orle *et al.* 1996) et al. 1996, Liu *et al.* 2000), tendo os melhores resultados sido obtidos com as sequências iniciadoras KO3A/KO4 e *polA-F/polA-R*, quando utilizadas isoladamente, assim como quando associadas

na mesma mistura de reacção, pelo que foram estas as utilizadas no estudo das amostras clínicas.

As várias técnicas de PCR experimentadas (PCR-47, PCR-*polA* e PCR-M) foram positivas em todos os casos de lesões de sífilis primária e secundária, desde que as lesões se encontrassem húmidas, à semelhança de resultados descritos por outros investigadores (Orle *et al.* 1996, Behets *et al.* 1999, Liu *et al.* 2000, Palmer *et al.* 2003).

Em relação aos vários tipos de produtos estudados (sangue, plasma, soro e exsudado de lóbulo de orelha), a técnica de PCR-47 foi a que identificou maior número de amostras contendo ADN de *T. pallidum*, tendo por si só, identificado 97% dos casos positivos com todas as técnicas de biologia molecular utilizadas. A mesma técnica, quando analisada em conjunto com a técnica de PCR-*polA*, identificou todas as amostras positivas. Por outro lado, a utilização da técnica de PCR-47 em amostras de exsudado de biopsia de lóbulo de orelha, contribuiu para os melhores resultados obtidos, sendo que a utilização deste tipo de amostra e de plasma com a técnica de PCR-47 identificaram todos os casos positivos.

As técnicas de PCR-diagnóstica estudadas parecem ser muito sensíveis e específicas no diagnóstico de sífilis primária e secundária, quando executadas em amostras de lesões, devendo as lesões estarem húmidas tal como acontece para o exame de microscopia de fundo escuro. A sua especificidade parece também ser elevada nos outros tipos de amostras estudadas, embora a sensibilidade em relação a estas, precise de ser melhorada, essencialmente quando se pretende efectuar o diagnóstico de sífilis latente. Uma vez que não existem lesões neste estágio, a pesquisa de *T. pallidum* tem obrigatoriamente que ser efectuada no sangue.

Marfin *et al.* (2001) demonstraram, pela primeira vez, a possibilidade de existência de *T. pallidum* a nível do sangue no estágio de sífilis latente, o que foi, também, observado neste estudo, uma vez que o ADN de *T. pallidum* foi identificado em cerca de 39% dos doentes estudados que se encontravam nesta fase da doença. Embora há muito tempo se tenha assumido que *T. pallidum* dissemina rapidamente e Tramont (1995b) o tivesse referido, o facto de neste trabalho se ter identificado ADN de *T. pallidum* em amostras de sangue de

indivíduos com sífilis primária e secundária são disso confirmação.

Um resultado positivo pelas três técnicas de PCR-diagnóstica, foi observado, numa amostra proveniente de um parceiro sexual de indivíduo infectado com sífilis. Este posteriormente tornou-se serologicamente reactivo, significando que provavelmente, o indivíduo estaria em período de incubação. Tal situação foi referida por Marfin *et al.* (2001), que demonstraram ADN de *T. pallidum* em quatro de oito doentes em período de incubação, por uma técnica de PCR com sequências iniciadoras tendo como alvo de amplificação o gene *polA* I, pelo que, se outros autores o confirmarem, as técnicas de PCR poderão vir a ser indicadas no estudo de contactos de indivíduos com sífilis, antes de apresentarem sintomatologia.

Em relação à aplicabilidade da técnica de PCR no diagnóstico de neurosífilis, esta parece ter uma boa especificidade nos indivíduos sem sífilis, pois não foi identificado ADN de *T. pallidum* em nenhuma amostra de liquor proveniente dos indivíduos do grupo controlo negativo.

Nas amostras de indivíduos com serologia reactiva no soro, o maior número de amostras positivas no liquor foi obtido com a técnica de PCR-47, que, em conjunto com a PCR-*polA* identificou todas as amostras positivas pelas três técnicas de biologia molecular. Além disso, estas técnicas poderão ser de utilidade nos indivíduos em que a invasão do sistema nervoso central é recente, ou em que por qualquer outro motivo, não existão alterações a nível do sistema nervoso central ou reactividade nos testes serológicos. Nestas amostras, a técnica de PCR poderá ter originado, quando muito, cerca de 11% de resultados de falsa negatividade no liquor, pelo que parece ter uma sensibilidade aceitável. De acordo com os resultados do presente estudo as técnicas de biologia molecular são provavelmente úteis no diagnóstico de alguns casos de neurosífilis, em que após execução dos testes serológicos as dúvidas de diagnóstico persistem.

A genotipagem de *T. pallidum*, se reprodutível e sensível, será de grande ajuda na compreensão da epidemiologia e patogenia da sífilis. Nesta tese, a técnica de subtipagem utilizada parece ser sensível na sífilis primária e secundária, tendo sido reprodutível em todas as amostras do mesmo doente. Infelizmente, o número de produtos recebidos do mesmo doente foi em pequena quantidade. A

técnica foi, no entanto, pouco sensível, sendo necessário torna-la mais eficaz. Na população estudada encontraram-se, tal como noutros estudos (Pillay *et al.* 1998, 2002, Sutton *et al.* 2001), génotipos múltiplos, tendo o 14c sido o subtipo mais frequentemente encontrado. O subtipo 10a foi o único subtipo ainda não identificado, sendo necessários mais estudos epidemiológicos para esclarecer se este é um subtipo apenas existente em Portugal ou proveniente de países com os quais se mantêm relações de proximidade, nomeadamente a nível de imigração.

Dos resultados desta tese e da sua comparação com o preconizado por outros autores, pode assim concluir-se que:

- O RPR é o teste não treponémico que deve ser utilizado sempre que se suspeita de sífilis e na monitorização terapêutica.
- Existe uma necessidade premente de desenvolver testes mais sensíveis e específicos para o diagnóstico de sífilis, essencialmente para os estádios de sífilis primária, neurosífilis e sífilis latente.
- A co-infecção VIH dá origem a resultados de falsa reactividade com os testes não treponémicos, o que é independente da existência de toxicodependência. Assim, nos doentes com VIH e sífilis torna-se necessária uma criteriosa avaliação dos testes laboratoriais, nomeadamente com confirmação pelos testes treponémicos. De notar que em muitos países em desenvolvimento, em que a infecção pelo VIH e a sífilis são prevalentes, se tem proposto apenas a utilização do RPR.
- Indivíduos com testes não treponémicos com falsa reactividade devem ser avaliados para a presença de anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Humana
- No que se refere aos testes treponémicos, apenas o TP.PA parece poder utilizar-se na monitorização do resultado da terapêutica. Os resultados obtidos neste estudo indicam que este treponémico poderá ser utilizado no diagnóstico no diagnóstico laboratorial de sífilis.

- O teste EIA é o teste treponémico que mais se adapta à rotina laboratorial, uma vez que se obtiveram resultados semelhantes aos dos testes treponémicos usualmente recomendados (TPHA e FTA-Abs), com a vantagem de ser automatizável e de leitura objectiva.
- A pesquisa de anticorpos específicos de tipo IgM, no sangue ou no liquor, não parece ser de grande valor no diagnóstico de sífilis precoce ou da neurosífilis, respectivamente.
- O RPR parece comportar-se de modo semelhante ao VDRL, quando se pretende efectuar o diagnóstico de neurosífilis.
- Os resultados obtidos com o TP.PA no liquor indicam que este pode ser utilizado para o diagnóstico de neurosífilis de modo idêntico ao TPHA e FTA-Abs.
- As técnicas de Western blot parecem ser as mais sensíveis e específicas para o diagnóstico de neurosífilis.
- As técnicas de biologia molecular parecem ser mais sensíveis e específicas no diagnóstico de sífilis primária e sífilis secundária. Precisam, no entanto, de ser aperfeiçoadas, de modo a tornarem-se mais sensíveis no que diz respeito à sífilis latente e neurosífilis. A técnica de PCR-47 foi a que melhores resultados apresentou, enquanto que o tipo de amostra indicada parece ser o exsudado de biópsia de lóbulo de orelha, seguida do plasma.
- Neste estudo ficou demonstrada a existência de *T. pallidum* no sangue de doentes com sífilis latente e no período de incubação.
- As técnicas de biologia molecular podem eventualmente ser úteis no diagnóstico de casos especiais de neurosífilis, nomeadamente quando a invasão do sistema nervoso central é recente ou quando por qualquer motivo não existem outros parâmetros indicativos dessa infecção.
- A técnica de subtipagem utilizada identificou todos os subtipos das amostras de úlceras genitais e de lesões de secundarismo, tendo sido reprodutível.
- Embora o subtipo 14c tenha sido o mais frequentemente encontrado, o subtipo 10a foi pela primeira vez identificado no presente estudo.

5.2. Perspectivas futuras

Tendo em conta as dificuldades por vezes encontradas no diagnóstico laboratorial de sífilis e confirmadas nesta tese, torna-se evidente que muito há ainda a fazer para que o diagnóstico desta infecção seja cada vez mais eficaz.

Na generalidade e depois da sequenciação do genoma de *T. pallidum* (Frazer *et al.* 1998), a comunidade científica está de acordo em que existe necessidade de:

- Estabelecer um sistema de isolamento de *T. pallidum* “in vitro” que permita a sua sobrevivência de modo contínuo.
- Desenvolver vacinas.
- Desenvolver novos testes diagnósticos que sejam rápidos, eficazes, baratos e que se possam efectuar sem equipamento laboratorial, tal como existem presentemente para a pesquisa de anticorpos anti-VIH
- Melhorar o conhecimento sobre a patogénese e epidemiologia da infecção.

Como perspectivas de trabalho futuro resultantes da presente tese importa realçar:

- A necessidade do desenvolvimento de um teste treponémico sensível e específico, que ao mesmo tempo permita a monitorização terapêutica, e que não seja reactivo nos doentes com sífilis correctamente tratada. O mesmo se aplica ao desenvolvimento de testes para pesquisa de anticorpos de tipo IgM que sejam reactivos na sífilis recente.
- A associação com outras patologias de resultados de falsa reactividade dos testes não treponémicos deve ser estudada na população portuguesa, essencialmente em grupos especiais como os portadores do vírus da hepatite C e migrantes.
- Estudos de comparação entre as técnicas de RPR e VDRL para o diagnóstico de neurosífilis devem ser efectuados, num número maior de indivíduos, uma

vez que os resultados deste estudo foram contraditórios às recomendações de diversos autores.

- Em relação ao diagnóstico de neurosífilis, será interessante monitorizar os doentes após a terapêutica, para verificar a normalização dos parâmetros citológicos e dos testes serológicos, de modo a avaliar o seu significado. A monitorização de indivíduos em cujas amostras as técnicas de PCR são positivas e os restantes parâmetros negativos é também importante, para se verificar a existência de invasão recente, invasão do sistema nervoso central sem desenvolvimento de alterações patológicas aparentes no liquor ou ainda, se serão devidas a infecção tratada com terapêutica antibiótica efectuada por outras razões que não a sífilis. A utilização simultânea da técnica de cultura por inoculação em coelho poderá ser, também, uma ajuda no esclarecimento destas questões.

- Relativamente à utilização das técnicas de biologia molecular no diagnóstico de sífilis ficou clara a necessidade de melhorar a sensibilidade da técnica, quando utilizadas amostras que não sejam de exsudados de lesões, quer estudando diferentes métodos de extracção, com quantificação ao longo de tempo, quer utilizando técnicas mais recentes, como por exemplo, a técnica de “Real Time PCR”. Esta é uma técnica que utiliza sondas “Taqman”, permitindo aumentar a sensibilidade de detecção obtida, quando se utiliza um gel de agarose adicionado de brometo de etídio.

- Num maior número de amostras é necessário confirmar, que o exsudado de biopsia de lóbulo de orelha é o melhor tipo de amostra a utilizar, para pesquisa de ADN de *T. pallidum* em doentes com sífilis latente e indivíduos em período de incubação.

- Futuros estudos de genotipagem de *T. pallidum* deverão ter como base a execução imediata da mesma, no seguimento da extracção de ADN, para evitar o armazenamento, o qual parece diminuir a sensibilidade da técnica.

- A tentativa de desenvolver uma técnica de subtipagem mais sensível será importante para se compreender melhor a epidemiologia e patogénese da infecção a *T. pallidum*. Um vez desenvolvidas técnicas de biologia molecular diagnóstica e de genotipagem mais sensíveis, será útil a sua aplicação em amostras de indivíduos com sífilis, residentes em Portugal e nos países de expressão portuguesa, assim como nos seus contactos, com o fim de determinar a existência de estirpes comuns.

Fica assim demonstrado que a sífilis é ainda hoje uma doença que entusiasma quem a ela se dedica, seja no campo epidemiológico, clínico, laboratorial ou de investigação e que provavelmente assim continuará durante alguns anos. No entanto, passo a passo, novas perspectivas se vão abrindo, como por exemplo as consequentes à sequenciação do seu genoma, que poderão contribuir para o controlo e prevenção desta infecção.

Bibliografia

Bibliografia

- Akins DR, Robison E, Shevchenko D, Elkins C, Cox DL, Radolf JD (1997).** Tromp1, a putative rare outer membrane protein, is anchored by an uncleaved signal sequence to *Treponema pallidum* cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **179**:5076-5086.
- Al-Semari AM, Bohlega SI, Cupler EJ, Al-Watban JA, McLean DR (2001).** Pitfalls in cerebrospinal fluid test for the diagnosis of neurosyphilis. *Saudi Med. J.* **22**:26-29.
- Anderson B, Stillman MT (1978).** False positive FTA in hydralazine-induced lupus. *JAMA.* **239**:1392-1393.
- Anderson J, Mindel A, Tovey SJ, Williams P (1989).** Primary and secondary syphilis, 20 years' experience. 3: Diagnosis, treatment, and follow up. *Genitourin. Med.* **65**:239-243.
- Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH (1996).** Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J. Bacteriol.* **178**:377-384.
- Ansell DA, Hu TC, Straus M, Cohen M, Sherer R (1994).** HIV and syphilis seroprevalence among clients with sexually transmitted diseases attending a walk-in clinic at Cook County Hospital. *Sex. Transm. Dis.* **21**:93-96.
- Appleman M E, Marshall D W, Brey R L, Houk R W, Beatty D C, Winn R E, Melcher G P, Wise M G, Sumaya C V, Boswell R N (1988).** Cerebrospinal fluid abnormalities in patients without AIDS who are seropositive for the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* **158**:193-199.
- Arroll TW, Centurion-Lara A, Lukehart SA, Van Voorhis WC (1999).** T-cell responses to *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* antigens during the course of experimental syphilis infection. *Infect. Immun.* **67**:4757-4763.
- Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases (1999a).** National guideline for the management of early syphilis. Clinical Effectiveness Group (Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases) *Sex.. Transm. Infect.* **75** Suppl 1:S29-33.
- Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases (1999b).** National guideline for the management of late syphilis. Clinical Effectiveness Group (Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases). *Sex. Transm. Infect.* **75** Suppl 1:S34-37.
- Augenbraun MH, DeHovitz JA, Feldman J, Clarke L, Landesman S, Minkoff HM (1994).** Biological false-positive syphilis test results for women infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **19**:1040-1044.
- Backhouse JL, Hudson BJ (1995).** Evaluation of immunoglobulin G enzyme immunoassay for serodiagnosis of yaws. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1875-1878.
- Bailey MJ, Penn CW, Cockayne A (1985).** Evidence for the presence of lipopolysaccharide in *Treponema phagedenis* (biotype Reiterii) but not in *Treponema pallidum* and other spirochetes. *Infect. Immun.* **33**:372-379.
- Baker BJ, Armelagos GJ (1988).** The origin and antiquity of syphilis. *Current. Anthropol.* **29**:703-720.
- Baker-Zander SA, Roddy RE, Handsfield HH, Lukehart SA (1986).** IgG and IgM antibody reactivity to antigens of *Treponema pallidum* after treatment of syphilis. *Sex Transm Dis.* **13**:214-220.
- Baker-Zander SA, Fohn MJ, Lukehart SA (1988).** Development of cellular immunity to individual soluble antigens of *Treponema pallidum* during experimental syphilis. *J. Immunol.* **141**:4363-4369.
- Balachandran C, Sabita L, Kanthraj GR (1997).** Perforation of hard palate in lues maligna associated with HIV infection. *Genitourin. Med.* **73**:225.
- Ball RW (1965).** Outbreak of infectious syphilis in South Carolina. *JAMA.* **193**:101-104.

- Barbeyrac (1996).** PCR: Preparation of DNA from clinical specimens. pp 61-64. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmatology*. Academic Press Inc.
- Baseman JB, Hayes EC (1980).** Molecular characterization of receptor binding proteins and immunogens of virulent *Treponema pallidum*. *J. Exp. Med.* **151**:573-586.
- Becerra LI, Ksiazek SM, Savino PJ, Marcus DK, Buckley RM, Sergott RC, Bosley TM (1989).** Syphilitic uveitis in human immunodeficiency virus-infected and noninfected patients. *Ophthalmology*. **96**:1727-1730.
- Behets FTM, Andriamiadana J, Randrianasolo D, Randriamanga R, Rasamilalao D, Chen CY, Weiss JB, Morse SA, Dallabetta G, Cohen M (1999).** Chancroid, primary syphilis, genital herpes, and lymphogranuloma venereum in Antananarivo, Madagascar. *J. Infect. Dis.* **180**:1382-1385.
- Belisle JT, Brandt ME, Radolf JD, Norgard MV (1994).** Fatty acids of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *J. Bacteriol.* **176**:2151-2157.
- Berger JR (1991).** Neurosyphilis in human immunodeficiency virus type 1-seropositive individuals. *Arch. Neurol.* **48**:700-702.
- Berry CD, Hooton TM, Collier AC, Lukehart SA (1987).** Neurologic relapse after benzathine penicillin therapy for secondary syphilis in a patient with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* **316**:1587-1589.
- Beyrer C, Jitwatcharanan K, Natpratan C, Kaewvichit R, Nelson KE, Chen C, Weiss JB, Morse SA (1998).** Molecular methods for the diagnosis of genital ulcer disease in a sexually transmitted disease clinic population in Northern Thailand: predominance of Herpes Simplex virus infection. *J. Infect. Dis.* **178**:243-246.
- Birry A, Kasatiya S (1979).** Evaluation of microhaemagglutination assay to determine treponemal antibodies in CSF. *Br. J. Vener. Dis.* **55**:239-244.
- Bishop NH, Miller JN (1976).** Humoral immunity in experimental syphilis. II. The relation ship of neutralizing of neutralizing factors in immune sera to acquired resistance. *J. Immunol.* **117**:197-207.
- Blanco DR, Radolf JD, Lovett MA, Miller JN (1986).** Correlation of treponemicidal activity in normal human serum with the presence of IgG antibody directed against polypeptides of *Treponema phagedenis* biotype Reiter and *Treponema pallidum*, Nichols strain. *J. Immunol.* **137**:2031-2036.
- Blanco DR, Walker EM, Haake DA, Chaption CI, Miller JN, Lovett MA (1990).** Complement activation and correlates of the in vitro treponemicidal activity and correlates with antibody-mediated aggregation of *Treponema pallidum* rare outer membrane protein. *J. Immunol.* **144**:1914-1921.
- Blanco DR, Reimann K, Skare J, Champion CI, Foley D, Exner MM, Hancock RE, Miller JN, Lovett MA, Blanco DR, Reimann K, Skare J, Champion CI, Foley D, Exner MM, Hancock RE, Miller JN, Lovett MA (1994).** Isolation of the outer membranes from *Treponema pallidum* and *Treponema vicentii*. *J. Bacteriol.* **176**:6088-6099.
- Blanco DR, Chaption CL, Exner MM, Erdjument-Bromage H, Handdcok RE, Tempst P, Lovett A (1995).** Porin activity and sequence analysis of a 31-kilodalton *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* rare outer membrane protein (Tomp1). *J. Bacteriol.* **177**:3556-3562.
- Bolan G (1998).** Syphilis in HIV infected hosts. Retirado em 22 de Maio de 2003 de <http://hivinsite.ucsf.edu.akb/1998/06syph/index.html>.
- Bordon J, Martinez-Vazquez C, Alvarez M, Miralles C, Ocampo A, de la Fuente-Aguado J, Sopena-Perez Arguelles B (1995).** Neurosyphilis in HIV-infected patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:864-869.
- Borisenko KK, Tichonova LI, Renton AM (1999).** Syphilis and other sexually transmitted infections in the Russian Federation. *Int. J. STD AIDS.* **10**: 665-668.
- Borobio MV, Ruiz JM, Perea EJ (1990).** Evaluación de una técnica inmunoenzimática en el diagnóstico de sífilis. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* **8**:486-489.

- Bowen DL, Lane HC, Fauci AS (1985).** Immunopathogenesis of the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* **103**:704-709.
- Brandt AM (1988).** The syphilis epidemic and its relation to AIDS. *Science*. **239**:375-380.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL (1999).** Host defence mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. **285**:732-736.
- Brothwell D (1970).** The real history of syphilis. *Sci. J.* **6**:27-33.
- Brown DL, Frank JE (2003).** Diagnosis and Management of Syphilis *Am. Fam. Physician*. **68**:283-290.
- Brown ST, Zaidi A, Larsen SA, Reynolds GH (1985).** Serological response to syphilis treatment. A new analysis of old data. *JAMA*. **253**:1296-1299.
- Bruisten SM, Cairo I, Fennema H, Pijl A, Buimer M, Peerbooms PGH, Van Dick E, Meijer A, Ossewaard J M, Doornum GJJ (2001).** Diagnosing genital ulcer disease in a clinic for sexually transmitted diseases in Amsterdam, the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **39**:601-605.
- Buchanan CS, Haserick JR (1970).** FTA-Abs test in pregnancy a probable false-positive reaction. *Arch. Derm.* **102**:322-325.
- Buist DGP, Pertile R, Morris GJ (1973).** Evaluation of the *Treponema pallidum* haemagglutination test. *Pathology*. **5**:249-252.
- Burdash NM, Hinds KK, Finnerty JA, Manos JP (1987).** Evaluation of the Bio-EnzaBead assay for the detection of treponemal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **25**:808-811.
- Burke JM, Schaberg DR (1985).** Neurosyphilis in the antibiotic era. *Neurology*. **35**:1368-1371.
- Burstain JM, Grimpel E, Lukehart SA, Norgard MV, Radolf JD (1991).** Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**:62-69.
- Byrne RE, Laska S, Bell M, Larson D, Phillips J, Todd J (1992).** Evaluation of a *Treponema pallidum* western immunoblot assay as a confirmatory test for syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **30**:115-122.
- Calderon W, Douville H, Nigro M, Bono G, Muratori S (1990).** Concomitant syphilitic and HIV infection: A case report. *Acta Neurol.* **12**:132-137.
- Cameron CE, Castro C, Lukehart SA, Van Boris WC (1998).** Function and protective capacity of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* glycerophosphodiesterase. *Infect. Immun.* **6**:5763-5760.
- Cameron CE, Castro C, Lukehart SA, Van Boris WC (1999).** Sequence conservation of glycerophosphodiesterase among *Treponema pallidum* strains. *Infect. Immun.* **7**:3168-3170.
- Campisi DC, Whitcomb C (1979).** Liver disease in early syphilis. *Arch. Intern. Med.* **139**:365-366.
- Canale-Parole E (1978).** Motility and chemotaxis of spirochetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**:69-99.
- Canoso RT, Zon LI, Groopman JE (1987).** Anticardiolipin antibodies associated with HTLV-III infection. *Br. J. Haematol.* **65**:495-498.
- Castro KG, Lieb S, Jaffe HW, Narkunas JP, Calisher CH, Bush TJ, Witte JJ (1988).** Transmission of HIV in Belle Glade, Florida: lessons for other communities in the United States. *Science*. **239**:193-197.
- Cates W Jr, Rothenberg RB, Blount JH (1996).** Syphilis control. The historic context and epidemiologic basis for interrupting sexual transmission of *Treponema pallidum*. *Sex. Transm. Dis.* **23**:68-75.
- Catterall RD (1972).** Presidential address to the M.S.S.V.D.: systemic disease and the biological false-positive reaction. *Br. J. of Vener Dis.* **48**:1-12.
- Caumes E, Janvier M (1995).** Syphilis.. In: *Encycl. Med. Chirur.* **12**:670-C10. Editions Techniques, Dermatologie.
- Centers for Disease Control and Prevention (1988).** Relationship of syphilis to drug use and

- prostitution Connecticut. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **37**:755-758.
- Centers for Disease Control and Prevention (1991a).** Alternative case-finding methods in a crack-related syphilis epidemic Philadelphia. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **40**:77-80.
- Center for Disease Control (1991b).** Sexually Transmitted Diseases Clinical Practices Guidelines. U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Atlanta, GA.; III-36-III-41.
- Centers for Disease Control and Prevention (1993).** Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **42**(RR14):27-46.
- Centers for Disease Control and Prevention (1998).** 1998 guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **47**:28-49.
- Centers for Disease Control and Prevention (2002a).** Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. Centers for Disease Control and Prevention. *Morbid. Mortal. Weekly Rep. Recomm. Rep.* **51**:1-78.
- Centers for Disease Control and Prevention (2002b).** Internet Use and Early Syphilis Infection Among Men Who Have Sex with Men - San Francisco, California, 1999-2003. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **52**:1229-1232.
- Centers for Disease Control and Prevention (2002c).** Primary and secondary syphilis – United States, 2000-2001. Centers for Disease Control and Prevention. *Morbid. Mortal. Weekly Rep. Recomm. Rep.* **51**:965-969.
- Centers for Disease Control and Prevention (2003).** Summary of notifiable diseases-United States, 2001. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **50**:i-xxiv, 1-108.
- Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Marra CM, Lukehart SA (1997).** Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1348-1352.
- Centurion-Lara A, Castro C, Castillo R, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Lukehart SA (1998).** The flanking region sequences of the 15-kDa lipoprotein gene differentiate pathogenic treponemes. *J. Infect. Dis.* **177**:1036-1040.
- Centurion-Lara Castro C, Barrett L, Cameron C, Mostowfi M, Wesley CV, Lukehart SA (1999).** *Treponema pallidum* major outer sheath protein homologue Tpr K is a target of opsonic antibody and the protective immune response. *J. Exp. Med.* **189**:647-656.
- Chaisson RE, Bacchetti P, Osmond D, Brodie B, Sande MA, Moss AR (1989).** Cocaine use and HIV infection in intravenous drug users in San Francisco. *JAMA.* **261**:561-565.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988).** Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids. Res.* **16**:11141-11156.
- Chamberlain RN, Brandt ME, Erwin AL, Radolf JD, Nogard MV (1989).** Major integral membrane protein immunogens of *Treponema pallidum* are proteolipids. *Infect. Immun.* **57**:2872-2877.
- Chapel TA (1980).** The signs and symptoms of secondary syphilis. *Sex. Transm. Dis.* **7**:161-164.
- Charon NW, Greenberg EP, Koopman MBH, Limberger RJ (1992).** Spirochete chemotaxis, motility, and the structure of the spirochetal periplasmic flagella. *Res. Microbiol.* **143**:597-603.
- Chen SY, Gibson S, Katz MH, Klausner JD, Dilley JW, Schwarcz SK, Kellogg TA, McFarland W (2002).** Continuing increases in sexual risk behaviour and sexually transmitted diseases among men who have sex with men: San Francisco, California.
- Chung KY, Lee MG, Lee JB (1994).** Detection of *Treponema pallidum* by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid of syphilis patients. *Yonsei Med. J.* **35**:190-197.
- Cockayne A, Bailey MJ, Penn CW (1987).** Analysis of sheath and core structures of the axial filament of *Treponema pallidum*. *J. Clin. Microbiol.* **133**:1397-1407.
- Cohen MS, Henderson GE, Aiello P, Zheng H (1998).** Successful eradication of sexually transmitted diseases in the People's Republic of China: implications for the 21 st century. *J.*

- Infec. Dis.* **174**:S223-229.
- Collart P, Borel LJ, Durel P (1964).** Significance of spiral organism found, after treatment, in late human and experimental syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* **40**:81-89.
- Communicable Disease Surveillance Centre (1998).** Syphilis in Bristol 1997-1998: an update. *Commun. Dis. Rep. CDR Wkly.* **8**:413-416.
- Communicable Disease Surveillance Centre (2000).** Increased transmission of syphilis in Manchester. *Commun. Dis. Rep. CDR Wkly.* **10**:89.
- Conde-Sendín MA, Hernández-Fleta JL, Cádeneas-Santana MA, Amela-Peris R (2002).** Neurosífilis: formas de presentación y manejo clínico. *Rev. Neurol.* **35**:380-386.
- Cox DL, Riley B, Chang P, Sayahtheri S, Tassell S, Hevelone J (1990).** Effects of molecular oxygen, oxidation-reduction potential, and antioxidants upon in vitro replication of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3063-3072.
- Cox DL, Chang P, McDowall A, Radolf JD (1992).** The outer membrane, not a coat of host proteins, limits the antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. *Infect. Immun.* **60**:1076-1083.
- Cox DL (1994).** Culture of *T. pallidum*. *Methods Enzymol.* **236**:390-405.
- Cox DL, Akins DR, Porcella SF, Nogard MV, Radolf JD (1995).** *Treponema pallidum* in gel microdroplets: a novel strategy for investigation of *Treponema* molecular architecture. *Mol. Microbiol.* **15**:1151-1164.
- Cox PM, Logan LC, Norins LC (1969).** Automated, quantitative micro-hemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies. *Appl. Microbiol.* **18**:485-489.
- Cox PM, Logan LC, Stout GW (1971).** Further studies of a quantitative automated microhemagglutination assay for antibodies to *Treponema pallidum*. *Public Health Lab.* **29**:43-50.
- Cummings MC, Lukehart SA, Marra C, Smith BL, Shaffer J, Demeo LR, Castro C, McCormack WM (1996).** Comparison of methods for the detection of *Treponema pallidum* in lesions of early syphilis. *Sex. Transm. Dis.* **23**:366-369.
- Cunningham TM, Miller JN, Lovett MA. (1987).** Identification of *Treponema pallidum* penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.* **169**:5298-5300.
- D'Allesandro G, Dardanoni L (1953).** Isolation and purification of the protein antigen of the Reiter treponeme. *Health Lab. Sci.* **14**:164-171.
- Daniels KC, Ferneyhough HS (1977).** Specific direct fluorescent antibody detection of *Treponema pallidum*. *Health Lab. Sci.* **14**:164-171.
- Dans PE, Cafferty L, Otter SE, Johnson RJ (1986).** Inappropriate use of the cerebrospinal fluid Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) test to exclude neurosyphilis. *Ann. Intern. Med.* **104**:86-89.
- Davis LE, Sperry S (1979).** The CSF-FTA test and significance of blood contamination. *Ann. Neurol.* **6**:68-69.
- Davis LE, Schmitt JW (1989).** Clinical significance of cerebrospinal fluid tests for neurosyphilis. *Ann. Neurol.* **25**:50-55.
- Deacon WE, Freeman EM, Harris A (1960).** Fluorescent treponemal antibody test. Modification based on quantitation (FTA-200). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **103**:827-829.
- Deacon WE, Hunter EF (1962).** Treponemal antigens as related to identification and syphilis serology. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **110**:352-356.
- Deacon WE, Falcon Harris A (1975).** A fluorescent test for treponemal antibodies. *JAMA.* **96**:477-480.
- Deguchi M, Hosoto H, Yamashita N, Ohmine T, Asari S (1994).** Evaluation of the gelatin particle agglutination method for determining *Treponema pallidum* antibody. *J. Japan Assoc. Infect. Dis.* **68**:1271-1277.
- Dempster WJ (1978).** Towards a new understanding of John Hunter. *Lancet* **1**:316-318.
- D'Errico MM, Mariottini M, Tombolesi P, Di Rosa S, Prospero E. Raffo M, Carle F (1996).**

- Syphilis and blood donors: comparison of two different diagnostic strategie. *Eur. J. Epidemiol.* **11**:77-80.
- Deschenes J, Seamone CD, Baines MG (1992).** Acquired ocular syphilis: diagnosis and treatment. *Ann. Ophthalmol.* **24**:134-138.
- Dettoni G, Grillo R, Mora G, Cavalli A, Alinovi A, Chezzi C, Sanna A. (1989).** Evaluation of Western immunoblotting technique in the serological diagnosis of human syphilitic infections. *Eur. J. Epidemiol.* **5**:22-530.
- Diaz T, Almeida MG, Georg I, Maia SC, De Souza RV, Markowitz LE (2004).** Evaluation of the determine rapid syphilis TP assay using sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**:98-101.
- Direcção Geral de Saúde - Divisão de Epidemiologia (2001).** Doenças de Declaração obrigatória 1994/2001. Estatísticas. pp 21. Direcção Geral de Saúde. Retirado a 25 de Novembro de 2003 de WWW.dgsaude.pt
- Direcção Geral de Saúde - Divisão de Epidemiologia (2002).** Doenças de Declaração obrigatória 1997/2001. Estatísticas. pp 21. Direcção Geral de Saúde. Retirado a 25 de Novembro de 2003 de WWW.dgsaude.pt
- Direcção Geral de Saúde - Direcção de Serviços de Informação e Análise - Divisão de Epidemiologia (2003).** Doenças de Declaração obrigatória 1998/2002. Estatísticas. pp 22. Direcção Geral de Saúde. Retirado a 25 de Novembro de 2003 de WWW.dgsaude.pt
- Dobson S R, Taber L H, Baughn R E (1988).** Recognition of *Treponema pallidum* antigens by IgM and IgG antibodies in congenitally infected newborns and their mothers. *J. Infect. Dis.* **157**: 903-910.
- Doherty L, Fenton KA, Jones J, Paine TC, Higgins SP, Williams D, Palfreeman A (2002).** Syphilis: old problem, new strategy. *BMJ.* **325**:153-156.
- Don PC, Rubinstein R, Christie S (1995).** Malignant syphilis (lues maligna) and concurrent infection with HIV. *Int. J.Dermatol.* **34**:403-407.
- Dowell ME, Ross PG, Musher DM, Cate TR, Baughn RE (1992).** Response of latent syphilis or neurosyphilis to ceftriaxone therapy in persons infected with human immunodeficiency virus. *Am. J. Med.* **93**:481-488.
- Drabick JJ, Tramont EC (1990).** Utility of the VDRL test in HIV-seropositive patients. *N. Engl. J. Med.* **322**:271.
- Ducas J, Robson HG (1981).** Cerebrospinal fluid penicillin levels during therapy for latent syphilis. *JAMA.* **246**:2583-2584.
- Duncan WC, Knox JM (1974).** Cephalixin therapy for infectious syphilis. *Arch. Dermatol.* **110**:77-80.
- Dyckman JD, Storms S, Huber T (1980).** Reactivity of microhemagglutination, fluorescent treponemal antibody absorption and venereal disease research laboratory tests in primary syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **12**:629-630.
- Eagle H, Fleischman R, Musselman AD (1950).** The effective concentration of penicillin in vitro and in vivo for streptococci, pneumococci and *Treponema pallidum*. *J. Bacteriol.* **59**: 625- 643.
- Ebel A,Vanneste L, Cardinaels M, Sablon E, Samson I, De Bosschere K, Hulstaert F, Zrein M (2000).** Validation of the INNO-LIA syphilis kit as a confirmatory assay for *Treponema pallidum* antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **38**:215-219.
- Egglestone SI, Turner AJ (2000).** Serological diagnosis of syphilis. PHLS Syphilis Serology Working Group. *Commun. Dis. Public Health.* **31**:58-62.
- Eisenstein BI (1990).** The polymerase chain reaction - a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N. Engl. J. of Med.* **323**:178-183.
- Erbelding EJ, Vlahov D, Nelson KE, Rompalo AM, Cohn S, Sanchez P, Quinn TC, Brathwaite W, Thomas DL (1997).** Syphilis serology in human immunodeficiency virus infection: Evidence for false-negative fluorescent treponemal testing. *J. Infect. Dis.* **176**:1397-1400.
- Escobar MR, Dalton HP, Allison MJ (1970).** Fluorescent antibody tests for syphilis using

- cerebrospinal fluid: clinical correlation in 150 cases. *Am. J. Clin. Pathol.* **53**:886-890.
- Eurotrials (2001).** Doenças Sexualmente Transmitidas. *Boletim Informativo* **6**:2-4.
- Faber WR, Bos JD, Rietra PJGM, Fass H, Van Eijk RVW (1983).** Treponemicidal levels of amoxicillin in cerebrospinal fluid after oral administration. *Sex. Transm. Dis.* **10**:148-150.
- Falcone VH, Stout GW, Moore BM (1964).** Evaluation of rapid plasma regain (circle) card test. *Public. Health Rep.* **79**:491-495.
- Farshy CE, Hunter EF, Helsel LO, Larsen SA (1985).** Four-step enzyme-linked immunosorbent assay for detection of treponemal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **21**:387-389.
- Fenno JC, Muller KH, McBride BC (1996).** Sequence analysis, expression, and binding activity of recombinant major outer sheath protein (Msp) of *Treponema denticola*. *J. Bacteriol.* **178**:2489-2497.
- Fenno JC, Wong GW, Hannam PM, Muller KH, Leung WK, McBride BC (1997).** Conservation of *msp*, the gene encoding the major outer membrane protein of oral *Treponema* spp. *J. Bacteriol.* **179**:1082-1089.
- Feraru ER, Aronow HA, Lipton RB (1990).** Neurosyphilis in AIDS patients: Initial CSF VDRL may be negative. *Neurology.* **40**:541-543.
- Fieldsteel AH, Cox DL, Moeckli RA (1981).** Cultivation of virulent *Treponema pallidum* in tissue culture. *Infect. Immun.* **32**:908-915.
- Finelli L, Budd J, Spitalny KC (1993).** Early syphilis. Relationship to sex, drugs, and changes in high-risk behavior from 1987-1990. *Sex. Transm. Dis.* **20**:89-95.
- Fisher DA, Chang LW, Tuffanelli DL. (1969).** Lues Maligna. Presentation of a case and a review of the literature. *Arch. Dermatol.* **99**:70-73.
- Fitzgerald TJ, Miller JN, Sykes JA (1975).** *Treponema pallidum* (Nichols strain) in tissue cultures: cellular attachment, entry, and survival. *Infect. Immun.* **11**:1133-1140.
- Fitzgerald TJ, Cleveland P, Johnson RC, Miller JN, Sykes JA (1977).** Scanning electron microscopy of *Treponema pallidum* (Nichols strain) attached to cultured mammalian cells. *J. Bacteriol.* **130**:1333-1344.
- Fitzgerald TJ (1981).** Pathogenesis and Immunology of *Treponema pallidum*. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**:29-54.
- Fiumara N (1989).** Human immunodeficiency virus infection and syphilis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**:141-142.
- Fiumara NJ (1978).** Treatment of early latent syphilis of less than one year's duration. *Sex. Transm. Dis.* **5**:85-88.
- Fiumara NJ (1979).** Serological responses to treatment of 128 patients with late latent syphilis. *Sex. Transm. Dis.* **6**:243-246.
- Fiumara NJ (1980a).** Treatment of primary and secondary syphilis. Serological response. *JAMA.* **243**:2500-2502.
- Fiumara NJ (1980b).** Reinfection primary, secondary, and latent syphilis. The serological response after treatment. *Sex. Transm. Dis.* **7**:111-115.
- Fiumara NJ (1986).** Treatment of early latent syphilis under 1 year's duration: serologic response to treatment of 368 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **15**:1059-1061.
- Fleming DT, Wasserheit JN (1999).** From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex. Transm. Inf.* **75**:3-17.
- Flood J, Weinstock H, Guroy ME, Bayne L, Simon RP, Bolan G (1998).** Neurosyphilis during the AIDS epidemic in San Francisco, 1985-1992. *J. Infect. Dis.* **177**:931-940.
- Forbes G, Rutter P, Abraham C (1991).** Significant cost saving with an automated syphilis screening test. *Transfusion.* **31**:S75.
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA,**

- Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Venter JC (1997).** Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*. **390**:580-586
- Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M, Ketchum KA, Sodergren E, Harham JM, McLeod MP, Salzberg S, Peterson J, Khalk H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M, Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, Fujii C, Garland S, Hatch B, Horst K, Roberts K, Sandusky M, Weidman J, Smith HO, Venter JC (1998).** Complete genome sequence of *Treponema pallidum* the syphilis spirochete. *Science*. **281**:375-388.
- Garcia-Rodriguez JA, Martin-Sanchez AM, Canut A, Garcia-Garcia L, Cacho J (1990).** VDRL and FTA-Abs reactivity in cerebrospinal fluid: our experience. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **8**:43-47.
- Garcia-Silva J, Velasco-Benito JA, Pena-Penabad C (1994).** Primary syphilis with multiple chancres and porphyria cutanea tarda in an HIV-infected patient. *Dermatology*. **188**:163-165.
- Garner MF, Bachouse JL (1971).** Fluorescent treponemal antibody tests on cerebrospinal fluid. *Br. J. Vener. Dis.* **47**:356-358.
- Garnett GP, Aral SO, Hoyle DV, Cates W Jr, Anderson RM (1997).** The natural history of syphilis. Implications for the transmission dynamics and control of infection. *Sex. Transm. Dis.* **24**:185-200.
- George R, Pope V, Fears M, Morrill B, Larsen SA (1998).** An analysis of the value of some antigen-antibody interactions used as diagnostic indicators in a treponemal western blot (TWB) test for syphilis. *J. Clin. Lab. Immunol.* **50**:27-44.
- George RW, Hunter EF, Fears MB (1998a).** Direct fluorescent antibody test for *Treponema pallidum* (DFA-TP), In: *A manual of tests for syphilis*. Larsen SA, Pope V, Johnson R, Kennedy Jr, E. J. (Ed), 9th ed. Washington DC American Public Health Association pp 135-146.
- George RW, Hunter EF, Fears MB (1998b).** Fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-Abs) test, In: *A manual of tests for syphilis*. Larsen SA, Pope V, Johnson R, Kennedy Jr, E. J. (Ed), 9th ed. Washington DC American Public Health Association pp 223-245.
- George RW, Pope V, Larsen SA (1998c).** Treponemal Western Blot test (TWB), In: *A manual of tests for syphilis*. Larsen S A, Pope V, Johnson R, Kennedy Jr, E. J. (Ed), 9th ed. Washington DC American Public Health Association pp. 346-361.
- George RW, Hunter EF, Fears MB (1998d).** Direct fluorescent antibody tissue test for *Treponema pallidum* (DFAT-TP), In: *A manual of tests for syphilis*. Larsen S A, Pope V, Johnson R, Kennedy Jr, E. J. (Ed), 9th ed. Washington DC American Public Health Association pp 148-156.
- Gerbase AC, Rowley JT, Heymann DH, Berkley SF, Piot P (1998a).** Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. *Sex. Transm. Infect.* **74** (Suppl 1): S12-16.
- Gerbase AC, Rowley JT, Mertens T (1998b).** Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet*. **351** (Suppl 3): S2-4.
- Ghys PD, Diallo MO, Ettiegne-Traor'e V, Yebou'e KM, Gnaor'e E, Lorougnon F, Kal'e K, Van Dyck E, Brettegaard, Hoyi YM (1995).** Genital ulcers associated with human immunodeficiency virus-related immunosuppression in female sex workers in Abidjan, Ivory Coast. *J. Infect. Dis.* **172**:1371-1374.
- Glatt AE, Stoffer HR, Forlenza S, Altieri RH (1991).** High-titer positive non-treponemal tests with negative specific treponemal serology in patients with HIV infection and or intravenous substance use. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **4**:861-864.
- Goff CW (1967).** Interesting survivals of antiquity. *Am. J. Orthop.* **9**:70-71.
- Gordon SM, Eaton ME, George R, Larsen S, Lukerhart SA, Kuypers J, Marra CM, Thompson S (1994).** The response of symptomatic neurosyphilis to high-dose intravenous penicillin G in patients with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **331**:1469-1473.
- Gourevitch MN, Selwyn PA, Davenny D, Buono D, Schoenbaum EE, Kleins RS, Friedland FH**

- (1993). Effects of HIV infection on the serologic manifestation and response to treatment of syphilis in intravenous drug users. *Ann. Intern. Med.* **118**:350-355.
- Grasse AJ, Orton SL, Notari IV E, Layug PL, Cable RG, Badon S, Popovsky MA, Gridon AJ, Lenes BA, Williams AE (1999).** Predictive value of past and current screening tests for syphilis in blood donors: changing from a rapid plasma reagin test to an automated specific treponemal test for screening. *Transfusion.* **39**:206-211.
- Greenstein DB, Wilcox CM, Schwartz DA (1994).** Gastric syphilis: report of seven cases and review of the literature. *J. Clin. Gastroenterol.* **18**:4-9.
- Greenwood AM, D'Alessandro U, Sisay F, Greenwood BM (1992).** Treponemal infection and the outcome of pregnancy in a rural area of The Gambia, West Africa. *J. Infect. Dis.* **166**:842-846.
- Gregory N, Sanchez M, Buchness MR (1990).** The spectrum of syphilis in patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Am. Acad. Dermatol.* **22**:1061-1067.
- Grimprel E, Sanchez PJ, Wendel GD, Burstain JM, McCracken GH, Radolf JD, Norgard MV (1991).** Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect *Treponema pallidum* in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1711-1718.
- Gschnait F, Schmidt BL, Luger A (1981).** Cerebrospinal fluid immunoglobulins in neurosyphilis. *Br. J. Vener. Dis.* **57**:238-240.
- Gue JW, Wang SJ, Lin YY, Liao KK, Wong WW (1993).** Neurosyphilis presenting as tabes dorsalis in a HIV-carrier. *China Med. J.* **51**:389-391.
- Guinan ME (1987).** Treatment of primary and secondary syphilis: defining failure at three- and six-month follow-up. *JAMA.* **257**:359-360.
- Haapasalo M, Muller KH, Uitto VJ, Leung WK, McBride BC (1992).** Characterization, cloning, and binding properties of the major 53-kilodalton *Treponema denticola* surface antigen. *Infect. Immun.* **60**:2058-2065.
- Hackett CJ (1963).** On the origin of the human treponematoses (pinta, yaws, endemic syphilis and venereal syphilis). *Bull. World Health Organ.* **29**:7-41.
- Hall LA (2002).** "The great scourge": syphilis as a medical problem and moral metaphor, 1880-1916. Retirado a 3 de Fevereiro de 2003 de <http://homepages.primex.co.uk/~leslevah/grtscrge.htm>.
- Halling VW, Jones MF, Bestrom JE, Wold AD, Rosenblatt JE, Smith TF, Cockerill FR III (1999).** Clinical comparison of the *Treponema pallidum* CAPTIA Syphilis-G enzyme immunoassay with the fluorescent treponemal antibody absorption immunoglobulin assay for syphilis testing. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3233-3234.
- Hambie EA, Larsen SA, Perryman MW, Pettit DE, Mullally RL, Whittington W (1983).** Comparison of a new rapid plasma reagin card test with the standard rapid plasma reagin 18-mm circle card test and the venereal disease research laboratory slide test for serodiagnosis of syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **17**:249-254.
- Hanff PA, Fehniger TE, Miller JN, Lovett MA (1982).** Humoral response in human syphilis to polypeptides of *Treponema pallidum*. *J. Immunol.* **129**:1287-1291.
- Hardham JM, Stamm LV, Porcella SF, Frye JG, Barnes NY, Howell JK, Mueller S L, Radolf JD, Weinstock GM, Norris SJ (1997).** Identification and transcriptional analysis of *Treponema pallidum* operon of *tp* operon encoding a putative ABC transport system, an iron-activated repressor protein homolog, and a glycolytic enzyme homolog. *Gene.* **197**:47-64.
- Hardy JB, Hardy PH, Oppenheimer EH, Ryan SJ, Jr, Sheff RN (1970).** Failure of penicillin in a newborn with congenital syphilis. *JAMA.* **212**:1345-1349.
- Harris A, Rosenberg AA, Riedel LM (1946).** A microflocculation test for syphilis using cardiolipin antigen: preliminary report. *J. Vener. Dis. Inform.* **27**:159-172.
- Hart G (1980).** Epidemiologic treatment for syphilis and gonorrhea. *Sex. Transm. Dis.* **7**:149-160.
- Hart G (1986).** Syphilis tests in diagnostic and therapeutic decision making. *Ann. Intern. Med.*

- 104:368-376.
- Hashisaki P, Wertzberger GG, Conrad GL, Nichols CR (1983).** Erythromycin failure in the treatment of syphilis in a pregnant woman. *Sex. Transm. Dis.* **10**:36-38.
- Hay PE, Clark JR, Taylor-Robinson D, Goldmeier D (1990a).** Detection of treponemal DNA in the CSF of patients with syphilis and HIV infection using the polymerase chain reaction. *Genitourin. Med.* **66**:428-432.
- Hay PE, Tam FW, Kitchen VS, Horner S, Bridger J, Weber J (1990b).** Gummatous lesions in men infected with human immunodeficiency virus and syphilis. *Genitourin. Med.* **66**:374-379.
- Hay PE, Taylor-Robinson D, Waldron S, Goldmeier D (1990c).** Amoxicillin, syphilis, and HIV infection. *Lancet.* **335**:474-475.
- Hayes NS, Muse KE, Collier AM, Baseman JB. (1977).** Parasitism by virulent *Treponema pallidum* of host cell surfaces. *Infect. Immun.* **17**:174-186.
- Henegariu OP, Hirshmann P, Kilian K, Kirsch S, Lengauer C, Maiwald R, Milke K, Vogt P (1994).** Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia.* **26**:97-106.
- Hensel U, Wellensiek HJ, Bhakdi S (1985).** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis immunoblotting as a serological tool in the diagnosis of syphilitic infections. *J. Clin. Microbiol.* **21**:82-87.
- Hernández-Aguado I, Bolumar F, Moreno R, Pardo FJ, Torres N, Belda J, Espacio A, Valencia Study Group on HIV Epidemiology (1998).** False-positive test for syphilis associated with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus infection among intravenous drug abusers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**:784-787.
- Hicks CB, Benson PM, Lupton GP, Tramont EC (1987).** Seronegative secondary syphilis in a patient infected with the human immunodeficiency virus (HIV) with Kaposi sarcoma. *Ann. Intern. Med.* **107**:492-495.
- Higgins SP, Sukthankar A, Mahto M, Jarvis RR, Lacey HB (2000).** Syphilis increases in Manchester, UK. *Lancet.* **355**:1466.
- Hollander DH (1981).** Treponematosis from pinta to venereal syphilis revisited: hypothesis for temperature determination of disease patterns. *Sex. Transm. Dis.* **8**:34-37.
- Hollander H (1988).** Cerebrospinal fluid normalities and abnormalities in individuals infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* **158**:855-888.
- Hook EW 3rd, Baker-Zander SA, Moskovitz BL, Lukehart SA, Handsfield HH (1986).** Ceftriaxone therapy for asymptomatic neurosyphilis. Case report and Western blot analysis of serum and cerebrospinal fluid IgG response to therapy. *Sex. Transm. Dis.* **13** (3 Suppl):S185-188.
- Hook EW 3rd (1989).** Syphilis and HIV infection. *J. Infect. Dis.* **160**:530-534.
- Hook EW 3rd. (1992).** Management of syphilis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Am. J. Med.* **93**:477-479.
- Hook EW 3rd (1994).** Diagnosing neurosyphilis. *Clin. Infect. Dis.* **18**:295-297.
- Hook EW 3rd, Stephens J, Ennis DM (1999).** Azithromycin compared with penicillin G benzathine for treatment of incubating syphilis. *Ann. Intern. Med.* **131**: 434-437.
- Hook EW III, Roddy RE, Lukehart SA, Hom J, Holmes KK, Tam MR (1985).** Detection of *Treponema pallidum* in lesion exsudate with a pathogen-specific monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **22**:241-244.
- Hook EW III, Roddy RE, Handsfield HH (1988).** Ceftriaxone therapy for incubating and early syphilis. *J. Infect. Dis.* **158**:881-884.
- Hook EW III, Marra CM (1992).** Acquired syphilis in adults. *N. Engl. J. Med.* **326**:1060-1069.
- Hooper NE, Malloy DC, Passen S (1994).** Evaluation of the *Treponema pallidum* enzyme immunoassay as a screening test for syphilis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1**:477-481.

- Hooshmand H, Escobar MR, Kopf SW (1972).** Neurosyphilis. A study of 241 patients. *JAMA*. **219**:726-728.
- Horowitz H W, Valsamis M P, Wicher V, Larsen S (1994).** Cerebral syphilitic gumma confirmed by the polymerase chain reaction in a man with human immunodeficiency virus (HIV) infection. *N. Engl. J. Med.* **331**:1488-1491.
- Hovind-Hougen K (1972).** Further observations on the ultra-structure of *Treponema pallidum* Nichols. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec.B.* **80**:297-304.
- Hsu PL, Chamberlain NR, Orth K, Moomaw C, Zhang LQ, Slaughter CA, Radolf JD, Sell S, Norgard MV (1989).** Sequence analysis of the 47-kilodalton major integral membrane immunogen of *Treponema pallidum*. *Infect. Immun.* **57**:196-203.
- Huber TW, Storms S, Young P, Phillips L E, Rogers T E, Moore D G, Williams R P (1983).** Reactivity of microagglutination, fluorescent treponemal antibody absorption, venereal disease research laboratory and rapid plasma reagin tests in primary syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **17**:405-409.
- Hudson EH (1946).** A unitarian view of treponematoses. *Am. J. Trop. Med.* **26**:135-139.
- Hudson EH (1963).** Treponematoses and anthropology. *Ann. Intern. Med.* **58**:1037-1048.
- Hudson EH (1965).** Treponematoses and man's social evolution. *Am. Anthropol.* **67**: 885-901.
- Hunte W, al-Ghraoui F, Cohen RJ (1993).** Secondary syphilis and the nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**:1351-1355.
- Hunter EF, Deacon WE, Mayer PE (1964).** An improved FTA-Abs test for syphilis: the absorption procedure (FTA-Abs). *Public Health Rep.* **79**:410-412.
- Hunter EF, Russell H, Farshy C E, Sampson J S, Larsen S A (1986).** Evaluation of sera from patients with Lyme disease in the fluorescent treponemal antibody-absorption test for syphilis. *Sex. Transm. Dis.* **13**:232-236.
- Hutchinson CM, Hook EW 3rd. (1990).** Syphilis in adults. *Med. Clin. North Am.* **74**:1384-1416.
- Hutchinson CM, Rompalo AM, Reichart CA, Hook EW (1991).** Characteristics of patients with syphilis attending Baltimore STD clinics. Multiple high-risk subgroups and interactions with human immunodeficiency virus infection. *Arch. Intern. Med.* **151**:511-516.
- Hutchinson CM, Hook III EW, Shepherd M, Verley J, Rompalo AM (1994).** Altered clinical presentation of early syphilis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Ann. Intern. Med.* **121**:94-100.
- Ijsselmuiden OE, Meinardi MM, van der Sluis JJ, Menke HE, Stolz E, van Eijk RV. (1987).** Enzyme-linked immunofiltration assay for rapid serodiagnosis of syphilis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**:281-285.
- Ijsselmuiden OE, van der Sluis JJ, Malde A, Stolz E, Bolton KP, van Eijk RV (1989a).** An IgM capture enzyme linked immunosorbent assay to detect IgM antibodies to treponemes in patients with syphilis. *Genitourin. Med.* **65**:79-83.
- Ijsselmuiden OE, Schouls LM, Stolz E, Aelbers GNM, Agterberg CM, Top J, Van Embden JDA (1989b).** Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant DNA-derived *Treponema pallidum* protein TmpA for diagnosis of syphilis and the potential use of TmpA for assessing the effect of antibiotic therapy. *J. Clin. Microbiol.* **27**:152-157.
- Innis MA, Gelfand DH (1990).** Optimization of PCRs, p.3-12. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ed.), *PCR protocols – a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., New York.
- Ito F, Hunter EF, George RW, Swisher BL, Larsen SA (1991).** Specific immunofluorescence staining of *Treponema pallidum* in smears and tissues. *J. Clin. Microbiol.* **29**:444-448.
- Ito F, Hunter EF, George RW, Pope V, Larsen SA (1992).** Specific immunofluorescent staining of pathogenic treponemes with a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **30**:831-838.
- Izzat NN, Bartruf JK, Glicksman JM, Holder WR, Knox JM (1971).** Validity of the VDRL test on

- cerebrospinal fluid contaminated by blood. *Br. J. Vener. Dis.* **47**:162-164.
- Jaffe HW (1975).** The laboratory diagnosis of syphilis. *Ann. Intern. Med.* **83**:846-850.
- Jaffe HW, Larsen SA, Jones OG, Dans PE (1978a).** Hemagglutination test for syphilis antibody. *Am. J. Clin. Pathol.* **70**:230-233.
- Jaffe HW, Larsen SA, Peters M, Jove DF, Lopez B, Schroeter AL (1978b).** Tests for treponemal antibody in CSF. *Arch. Intern. Med.* **138**:252-255.
- Jaffe HW, Kabins SA (1982).** Examination of cerebrospinal fluid in patients with syphilis. *Rev. Infect. Dis.* **4**:S842-847.
- Janier M, Saada A (1989).** Dela vénéréologie aux maladies sexuellement transmissibles. *Ann. Dermatol. Venereol.* **116**:957-964.
- Jethwaa HS, Scocchintiz JL, Dallabetta G, Behet, F, Hofman I, Hamilton H, Lule G, Coen M, Folds J (1995).** Comparison of molecular and microscopic techniques for detection of *Treponema pallidum* in genital ulcers. *J. Clin. Microbiol.* **33**:180-183.
- Johns DR, Tierney M, Felsenstein D (1987).** Alteration in the natural history of neurosyphilis by concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.* **316**:1569-1572.
- Johnson PC, Farnie M A (1994).** Testing for syphilis. *Dermatol. Clin.* **12**:9-17.
- Johnston N A (1972).** Neonatal congenital syphilis. Diagnosis by the absorbed fluorescent treponemal antibody (IgM) test. *Br. J. Vener. Dis.* **48**:464-469.
- Johnson RC, Ritzi DM, Livermore BP (1973).** Outer envelope of virulent *Treponema pallidum*. *Infect. Immun.* **8**:291-295.
- Jordan KG (1988).** Modern neurosyphilis-a critical analysis. *West J. Med.* **149**:47-57.
- Joyanes P, Borobio VM, Árquez JM, Perea E (1998).** The association of false-positive Rapid Plasma Reagin results and HIV infection. *Sex. Transm. Dis.* **25**:569-571.
- Jue R, Puffer J, Wood R, Scchooochet G, Smartt W, Ketterer W (1967).** Comparison of fluorescent and conventional dark field methods for the detection of *Treponema pallidum* in syphilis lesions. *Am. J. Clin. Pathol.* **47**:809-811.
- Jurado RL, Campbell J, Martin PD (1993).** Prozone phenomenon in secondary syphilis: Has its time arrived? *Arch. Intern. Med.* **153**:2496-2498.
- Kasatiya S, Birry A (1980).** Ruth evaluation of the micro-haemagglutination test to determine treponemal antibodies in CSF. *Br. J. Vener. Dis.* **56**:77-80.
- Kastanova V (1995).** Increasing sexually transmitted disease rates among prostitutes in the Czech Republic. *J. Commun. Health.* **20**:219-222.
- Katz DA, Berger JR (1989).** Neurosyphilis in acquiredimmunodeficiency syndrome. *Arch. Neurol.* **46**:895-898.
- Katz DA, Berger JR, Duncan RC (1993).** Neurosyphilis. A comparative study of the effects of infection with human immunodeficiency virus. *Arch. Neurol.* **50**:243-249.
- Kaufman RE, Blount JH, Jones O G (1974).** Current trends in syphilis. *Public Health Rev.* **3**:175-198.
- Keir G (1994).** Cerebrospinal fluid proteins in neurosyphilis and HIV infection. *Int. J. STD AIDS.* **5**:310-317.
- Kenedy JE (1998).** Microhemagglutination assay for antibodies to *Treponema pallidum* (MHA-TP). In: *A manual of tests for syphilis*. Larsen SA, Pope V, Johnson R, Kennedy Jr, E. J. (Ed), 9th ed. Washington DC American Public Health Association pp 273-288.
- Kennedy Jr JE, Creighton ET (1998a).** Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) slide tests. In: *A manual of tests for syphilis*. Larsen SA, Pope V, Johnson R, Kennedy Jr, E. J. (Ed), 9th ed. Washington DC American Public Health Association pp 157-178.
- Kennedy Jr JE, Creighton ET (1998b).** Darkfiel microscopy for the detection and identification of *treponema pallidum*. In: *A manual of tests for syphilis*. Larsen, S. A., Pope, V., Johnson, R.,

- Kennedy Jr, E. J. (Ed), 9th ed. Washington DC American Public Health Association pp 120-134.
- Kimsey RB, Spielman A (1990).** Motility of Lyme disease spirochetes in fluid as viscous as the extracellular matrix. *J. Infec. Dis.* **162**:1205-1208.
- Kitchen VS, Cook T, Doble A, Harris JR (1988).** Gummatous penile ulceration and generalized lymphadenopathy in homosexual man: Case report. *Genitourin. Med.* **64**:276-279.
- Kobayashi S, Yamaya SI, Sugahara T, Matuhasi T (1983).** Microcapsule agglutination test for *Treponema pallidum* antibodies. A new serodiagnostic test for syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* **59**:1-7.
- Kolman CJ, Cwnturion-Lara A, Lukehart SA, Owsley DW, Tuross N (1999).** Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* in a 200 year old skeletal specimen. *J. Infect. Dis.* **180**:2060-2063.
- Kraus SJ, Haserick JR, Logan LC, Bullard JC (1971).** Atypical fluorescence in the fluorescent treponemal-antibody-absorption (FTA-ABS) test related to deoxyribonucleic acid (DNA) antibodies. *Immunol.* **106**:1665-1669.
- Kreis J, Caraël M, Meheus A (1988).** Role of sexually transmitted diseases in transmitting human immunodeficiency virus. *Genitour. Med.* **64**:219-222.
- Kunawararak P, Beyrer C, Natpratan C, Feng W, Celentano DD, Boer M, Nelson KE, Khamboonruang C (1995).** The epidemiology of HIV and syphilis among male commercial sex workers in northern Thailand. *AIDS.* **9**:517-521.
- Lane HC, Masur H, Edgar IC, Whalen G, Rook AH, Franci AS (1983).** Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* **309**:453-458.
- Lanska MJ, Lanska DJ, Schmidley JW (1988).** Syphilitic polyradiculopathy in a HIV-positive man. *Neurology.* **38**:1297-1301.
- Larsen SA, Hambie EA, Pettit DE, Perryman MW, Kraus SJ (1981).** Specificity, sensitivity and reproducibility among fluorescent treponemal antibody-absorption test, the microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **14**:441-445.
- Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH (1995).** Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:1-21.
- Larsen SA, Creighton ET (1998).** Rapid Plasma Reagin (RPR) 18 mm circle card test. In: *A manual of tests for syphilis*. Larsen SA, Pope V, Johnson R, Kennedy Jr, E. J. (Ed), 9th ed. Washington DC American Public Health Association pp 193-207.
- Larsen SA, Johnson RE (1998).** Diagnostic test. In: Larsen S, Pope V, Johnson RE, Kennedy ED, eds. *A manual of tests for syphilis*. 9th ed. Washington, DC: American Public Health Association, pp:1-52.
- Larsen SA, Norris SJ, Steiner BM, Rudolph AH (1998).** Syphilis and related treponematoses. In: *Microbiology and Microbial Infections*. Vol. 3, Hausler W, J Jr, and Sussman M, (Eds.), New York: Oxford University Press, Inc. pp. 641-668.
- Last J M (1988).** "A dictionary of epidemiology" 2nd ed. New York: Oxford University Press.
- Lee CB, Brunham RC, Sherman E, Harding GK (1987).** Epidemiology of an outbreak of infectious syphilis in Manitoba. *Am. J. Epidemiol.* **125**:277-283.
- Lee JB, Farshy CE, Hunter EF, Hambie EA, Wobig GH, Larsen SA (1986).** Detection of immunoglobulin M in cerebrospinal fluid from syphilis patients by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **24**:736-740.
- Lefevre JC, Prere MF, Abbai M, Lareng MB (1983).** Quantitative determination of FTA abs IgM in different stages of syphilis before and after treatment. *Ann. Dermatol. Venereol.* **110**:425-430.
- Lefevre JC, Bertrand MA, Bauridaud R (1990).** Evaluation of the CAPTIA enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G and M to *Treponema pallidum* in syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1704-1707.
- Li H, Ruby J, Charon N, Kuramitsu H (1996).** Gene inactivation in the oral spirochete

- Treponema denticola*: construction of an flgE mutant. *J. Bacteriol.* **178**:3664-3667.
- Lien E, Sellati T, Yoshimura A, Flo T, Rawadi G, Finberg R, Carrol J, Espevik T, Ingaliis R, Radolf J, Golenbock D (1999).** Toll-like receptor 2 functions as patterns recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* **274**:33419-33425.
- Limberger RJ, Slivinski LL, Samsonoff WA (1994).** Genetic and biochemical analysis of the flagellar hook of *Treponema phagedenis*. *J. Bacteriol.* **176**:3631-3637.
- Limberger RJ, Slivinski LL, IZard J, Samsonoff WA (1999).** Insertional inactivation of *Treponema denticola* tap 1 results in a nonmotile mutant with elongated flagellar hooks. *Clin. Immun.* **91**:310-313.
- Liu H, Rodes B, Chen CY, Steiner B (2001).** New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1941-1946.
- Livingstone FB (1991).** On the origin of syphilis: an alternative hypothesis. *Curr. Anthropol.* **32**:587-590.
- Luger A, Schmidt BL, Steyer K, Schonwald E (1981).** Diagnosis of neurosyphilis by examination of the cerebrospinal fluid. *Br. J. Vener. Dis.* **57**:232-237.
- Luger A, Marhold I, Schmidt (1988).** Laboratory support in the diagnosis of neurosyphilis. *WHO/VDT/RES.* **379**:1-25.
- Luger AF, Schmidt BL, Kaulich M (2000).** Significance of laboratory findings for the diagnosis of neurosyphilis. *Int. J. STD AIDS.* **11**:224-234.
- Lugtenberg B, Van Alphen L (1983).** Molecular architecture and functioning of outer of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **737**:51-115.
- Lukehart SA, Miller JN (1978).** Demonstration of in vitro phagocytosis of *Treponema pallidum* by rabbits peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **121**:2014-2024.
- Lukehart SA, Baker-Zander SA, Sell S (1980).** Characterization of lymphocyte responsiveness in early experimental syphilis. I. In vitro response to mitogens and *Treponema pallidum* antigens. *J. Immunol.* **124**:454-460.
- Lukehart SA, Baker-Zander SA, Guishi Jr ER (1982).** Identification of *Treponema pallidum* antigens: comparison with a nonpathogenic treponeme. *J. Immunol.* **129**:833-835.
- Lukehart SA, Baker-Zander SA, Sell S (1986).** Characterization of the humoral immune response of the rabbit to antigens of *Treponema pallidum* after experimental infection and therapy. *Sex. Transm. Dis.* **13**:9-15.
- Lukehart SA, Hook EW 3rd, Baker-Zander SA, Collier AC, Critchlow CW, Handsfield HH (1988).** Invasion of the central nervous system by *Treponema pallidum*: implications for diagnosis and treatment. *Ann. Intern. Med.* **109**:855-862.
- Lukehart SA, Fohn MJ, Baker-Zander SA (1990).** Efficacy of azithromycin for therapy of active syphilis in the rabbit model. *J. Antimicrob. Chemother.* **25** Suppl A: S91-99.
- Luxon L, Lees AJ, Greenwood RJ (1979).** Neurosyphilis today. *Lancet.* **1**:90.
- MaCabe E, Jaffe LR, Diaz A (1993).** Human Immunodeficiency virus seropositivity in adolescents with syphilis. *Pediatrics.* **92**:695-698.
- Mackey DM, Price EV, Knox JM, Scotti A. (1969).** Specificity of the FTA-ABS test for syphilis. *JAMA.* **207**:1683-1685.
- MacLean S, Luger A (1996).** Finding neurosyphilis without the Venereal Disease Research Laboratory test. *Sex. Transm. Dis.* **23**:392-394.
- Magnarelli LA, Miller JN, Anderson JF, Riviere GR (1990).** Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1276-1279.
- Mahoney JF, RC Arnold, AD. Harris (1943).** Penicillin treatment of early syphilis. *Am. J. Public Health.* **33**:1387-1391.
- Mahoney JF, Arnold RC, Harris A (1949).** Penicillin treatment of early syphilis- first four patient

- after six years. *J. Vener. Dis. Inform.* **30**:350-355.
- Mahony JDH, Harris JRW, Sydney McCann J (1972).** Evaluation of the CSF FTA ABS test in latent and tertiary treated syphilis. *Acta Derm. Venereol.* **52**:71-74.
- Malone JL, Wallace MR, Hendrick BB, LaRocco A Jr, Tonon E, Brodine SK, Bowler WA, Lavin BS, Hawkins RE, Oldfield EC 3rd (1995).** Syphilis and neurosyphilis in a human immunodeficiency virus type-1 seropositive population: evidence for frequent serologic relapse after therapy. *Am. J. Med.* **99**:55-63.
- Marangoni A, Sambri V, Olmo A, D'Antuono A, Negosanti M, Cevenini R (1999).** IgG western blot as a confirmatory test in early syphilis. *Zentralbl. Bakterio.* **289**:125-133.
- March RW, Stiles GE (1980).** The reagin screen test a new reagin card test for syphilis. *Sex. Transm. Dis.* **7**:66-70.
- Marchitto KS, Jones SA, Schell RF, Holmans PL, Nogard MV (1984).** Monoclonal analysis of specific antigenic similarities among pathogenic *Treponema pallidum* subspecies. *Infect. Immun.* **45**:660-666.
- Marchitto KS, Selland-Grossling CK, Nogard MV (1986).** Molecular specificities of monoclonal antibodies directed against virulent *Treponema pallidum*. *Infect. Immun.* **51**:168-176.
- Marfin AA, Liu H, Sutton MY, Steiner B, Pillay A, Markowitz LE (2001).** Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **40**:163-166.
- Margo CE, Hamed LM (1992).** Ocular syphilis. *Surv. Ophthalmol.* **37**:203-220.
- Markovitz DM, Beutner KR, Maggio RP, Reichman RC (1986).** Failure of recommended treatment for secondary syphilis. *JAMA.* **255**:1767-1768.
- Marra CM, Slatter V, Tartaglione TA, Baker-Zander SA, Lukehart SA (1992).** Evaluation of aqueous penicillin G and ceftriaxone for experimental neurosyphilis. *J. Infect. Dis.* **165**:396-397.
- Marra CM, Critchlow CW, Hook EW, Collier AC, Lukehart S (1995).** Cerebrospinal fluid treponemal antibodies in untreated early syphilis. *Arch. Neur.* **52**:68-72.
- Marra CM, Gary DW, Kuypers J, Jacobson MA. (1996).** Diagnosis of neurosyphilis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* **174**:219-221.
- Marra CM, Boutin P, McArthur J C, Hurwitz S, Simpson P. A, Haslett J. A, van der Horst C, Nevin T, Hook E W 3rd (2000).** A pilot study evaluating ceftriaxone and penicillin G as treatment agents for neurosyphilis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Clin. Infect. Dis.* **30**:540-544.
- Marra CM, Maxwell CL, Smith SL, Lukehart SA, Rompalo AM, Eaton M, Stoner BP, Augenbraun M, Barker DE, Corbett JJ, Zajackowski M, Raines C, Nerad J, Kee R, Barnett SH (2004).** Cerebrospinal fluid abnormalities in patients with syphilis: association with clinical and laboratory features. *J. Infect. Dis.* **189**:369-376.
- Mathers DA, Leung WK, Fenno JC, Hong Y, McBride BC (1996).** The major surface protein complex of *Treponema denticola* depolarizes and induces ion channels in HeLa cell membranes. *Infect. Immun.* **64**:2904-2910.
- Matlow AG, Rachlis AR (1990).** Syphilis serology in human immunodeficiency virus-infected patients with symptomatic neurosyphilis: Case report and review. *Rev. Infect. Dis.* **12**:703-707.
- Matthews HM, Yang TK, Jenkin HM (1979).** Unique lipid composition of *Treponema pallidum* (Nichols strain). *Infect. Immun.* **24**:713-719.
- Mayer MP, Malan A (1989).** Rheumatoid factor in congenital syphilis. *Genitorin. Med.* **65**:304-307.
- McBroom RL, Styles AR, Chiu MJ, Clegg C, Cockerell CJ, Radolf, JD (1999).** Secondary syphilis in persons infected with and not infected with HIV- 1: a comparative immunohistologic study. *Am. J. Dermatopathol.* **21**: 432-441.
- McCracken GH, Ginsburg C, Crane DF, Zweighaft TC (1973).** Clinical phenomenology of penicillin in newborn infants. *J. Pediatr.* **82**:692-698.

- McLeish WM, Pulido JS, Holland S, Culbertson WW, Winward K (1990).** The ocular manifestations of syphilis in the human immunodeficiencyvirus type 1-infected host. *Ophthalmology*. **97**:196-203.
- Mertz KJ, Weiss JB, Webb RM, Levine WC, Lewis JS, Orle KA, Totten PA, Overbaugh J, Morse SA, Currier MM, Fishbein M, St Louis ME (1998).** An investigation of genital ulcers in Jackson, Mississippi, with use of a multiplex polymerase chain reaction assay: high prevalence of chancroid and human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **178**:1060-1066.
- Meyer C, Jung C, Kohl T, Poenicke A, Poppe A, Alt KW. (2002).** Syphilis 2001 – a palaeopathological reappraisal. *HOMO*. **53**:39-58.
- Meyer MP, Eddey T, Baughn RE (1994).** Analysis of western blotting (immunoblotting) technique in diagnosis of congenital syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **32**:629-633.
- Miao RM, Fieldsteel AH (1980).** Genetic relationship between *Treponema pallidum* and *Treponema pertenue*, two noncultivable human pathogens. *J. Bacteriol.* **141**:427-429.
- Mindel A, Tovey SJ, Timmins DJ, Williams P (1989).** Primary and secondary syphilis, 20 years' experience. 2. Clinical features. *Genitourin. Med.* **65**:1-3.
- Mohr JA, Griffiths W, Jackson R, Saadah H, Bird P, Riddle J (1976).** Neurosyphilis and penicillin levels in cerebrospinal fluid. *JAMA*. **236**:2208-2209.
- Moore MB, Price EV, Knox JM, Elgin LW (1963).** Epidemiologic treatment of contacts to infectious syphilis. *Public Health Rep.* **78**:966-970.
- Morrison A (1992).** On syphilis and the earan otologist's view. *Genitourin. Med.* **68**:420-422.
- Morrison RE, Harrison SM, Tramont EC (1985).** Oral amoxicillin, an alternative treatment for neurosyphilis. *Genitourin Med.* **61**:359-362.
- Morse SA, Trees DL, Htun Y, Radebe F, Orle KA, Dangor Y, Beck-Sague CM, Schmid S, Fehler G, Weiss JB, Ballard RC (1997).** Comparison of clinical diagnosis and standard laboratory and molecular methods for the diagnosis of genital ulcer disease in Lesotho: association with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **175**:583-589.
- Moskophidis, M, Muller F (1984a).** Molecular analysis of immunoglobulins M and G immune response to protein antigens of *Treponema pallidum* in human syphilis. *Infect. Immun.* **43**:127-132.
- Moskophidis, M, Muller F (1984b).** Molecular characterization of glycoprotein antigens on surface of *Treponema pallidum*: comparison with nonpathogenic *Treponema phagedenis* biotype Reiter. *Infect. Immun.* **46**:867-869
- Muller F (1986).** Review: specific immunoglobulin M and G antibodies in the rapid diagnosis of human treponemal infections. *Diagn. Immunol.* **4**:1-9.
- Musher DM, Hamill RJ, Baughn RE (1990).** Effect of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the course of syphilis and on the response to treatment. *Ann. Intern. Med.* **113**:872-881.
- Musher DM (1991).** Syphilis, neurosyphilis, penicillin, and AIDS. *J. Infect. Dis.* **163**:1201-1206.
- Musher DM (1999).** Early syphilis. In: Holmes K, Sparling P, Mardh PA, *et al.*, eds. *Sexually Transmitted Diseases*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, pp.:479-485.
- Nandwani R, Evans D T (1995).** Are you sure it's syphilis? A review of false positive serology. *Int. J. STD. AIDS*. **6**:241-248.
- Nayar R, Campos JM (1993).** Evaluation of DCL Syphilis-G enzyme immunoassay test kit for the serologic diagnosis of syphilis. *Am. J. Clin. Pathol.* **99**:282-285.
- NCBI Microbial Genomes Annotation Project (2001).** NC 000919 *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* str. Nichols. Retirado a 5 de Outubro de 2003 de <http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- Nelson RA Jr, Mayer MM (1949).** Immobilization of *Treponema pallidum* in vitro by antibody produced in syphilitic infection. *J. Exp. Med.* **89**:369-393.
- Newell J, Senkoro K, Mosha F, Grosskurth H, Nicoll A, Barongo L (1993).** A population-based

- study of syphilis and sexually transmitted disease syndromes in north-western Tanzania. 2. Risk factors and health seeking behaviour. *Genitourin. Med.* **69**:421-426.
- Nicolis G, Loucopoulos A (1974).** Cephalothin in the treatment of syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* **50**:270-271.
- Nielsen SL, Young KKY, Barbour AG (1990).** Detection of *Borrelia burgdorferi* by the polymerase chain reaction. *Moll. Cell. Probes* **4**:73-79.
- Nogard MV (1993).** Clinical and diagnosis issues of acquired and congenital syphilis encompassed in current syphilis epidemic. *Current Opinion in Infectious Diseases* **6**:9-16.
- Noordhoek GT, Conayne A, Schouls LM, Meleoen RH, Stolz E, Van Embden, JD (1990).** A new attempt to distinguish serologically the subspecies of *Treponema pallidum* causing syphilis and yam. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1600-1607. (Erratum, **28**:2853).
- Noordhoek GT, Wolters EC, Jonge MEJ van Embden JD (1991).** Detection by polymerase chain reaction of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid from neurosyphilis patients before and after treatment. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1976-1984.
- Norgard MV, Chamberlain NR, Swancutt MA, Goldberg MS (1986).** Cloning and expression of the major 47-kilodalton surface immunogen of *Treponema pallidum* in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **54**:500-506.
- Norris SJ (1982).** In vitro cultivation of *Treponema pallidum*: independent confirmation *Infect. Immun.* **36**:437-439.
- Norris SJ, Charon NW, Cook RG, Fuentes MD, Limberger RJ (1988).** Antigenic relatedness and N-terminal sequence homology define two classes of periplasmic flagellar proteins of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* and *Treponema phagedenis*. *J. Bacteriol.* **170**:4072-4082.
- Norris SJ, Treponema pallidum Polypeptide Research Group (1993).** Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Microbiol. Rev.* **57**:750-779.
- Norris SJ, Weinstock GM (2000).** The genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: will clinicians benefit? *Curr. Opin. Infect. Dis.* **13**:29-36.
- Norris SJ, Cox DL, Weinstock GM (2001).** Biology of *Treponema pallidum*: correlation of functional activities with genome sequence data. In *The Spirochetes: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press, Wymondham. UK cap.18:173-202.
- O' Rourke M, Ison CA, Renton AM, Spratt BG (1995).** Opa-typing: a high resolution tool for studying the epidemiology of gonorrhoea. *Mol. Microbiol.* **17**:865-875.
- O'Mahony C, Rodgers CA, Mendelsohn SS, Sissons G, McKay A, Devine J, Keeping IM (1997).** Rapidly progressive syphilis in early HIV infection. *Int. J. STD AID.* **8**:275-277.
- O'Neill P, Nicol C S (1972).** IgM class antitreponemal antibody in treated and untreated syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* **48**:460-603.
- Onoda, Y.1979.** Clinical evaluation of amoxycillin in the treatment of syphilis. *J. Int. Med. Res.* **7**: 539-545.
- Orle KA, Gates CA, Martin DH, Body BA, Weiss JB (1996).** Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *J. Clin. Microbiol.* **34**:49-54.
- Orton SH, Liu H, Dodd RY, Williams AE (2002).** Prevalence of circulating *Treponema pallidum* DNA and RNA in blood donors with confirmed-positive syphilis tests. *Transfusion.* **42**:94-99.
- Pahwa SG, Quilop MTJ, Lange M, Pahwa RN, Grieco MH (1984).** Deficit B-lymphocyte function in homosexual men in relation to the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Inter. Med.* **101**:757-763.
- Palmer, H. M., Higgins, S. P., Herring, A. J., Kingston, M. A. (2003).** Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex. Transm. Infect.* **79**:479-483.
- Parham CE, Pettit DE, Larsen SA, Hambie EA, Perryman MW, McGrew BE (1984).** Interlaboratory comparison of the toluidine red unheated serum test antigen preparation. *J. Clin.*

Microbiol. **20**:434-437.

Pâris-Hamelin A, Debruyne M, Fustec-Isarboure S (1999). L'immuno-empreinte pour le serodiagnostic de la syphilis. Un candidat pour remplacer le test de Nelson e Mayer. *Ann. Pharm Fr.* **57**:68-75.

Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, Stanton TB, Zablen L, Mandelco L, Woese CR (1991). Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J. Bacteriol.* **173**:6101-6109.

Pavia CS, Folds JD, Baseman JB (1978). Cell-mediated immunity during syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* **54**:144-150.

Pedersen NS, Axelsen N H, Petersen C S (1981). Antigenic analysis of *Treponema pallidum*: cross-reactions between individual antigens of *T. pallidum* and *T. Reiter*. *Scand. J. Immunol.* **13**:143-150.

Pedersen NS, Petersen CS, Axelsen NH (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody against the Reiter treponeme flagellum in syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **16**:608-614.

Pedersen NS, Orum O, Muoritsen S (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to venereal disease research laboratory (VDRL) antigen in syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1711-1716.

Pedersen NS, Sheller JP, Ratnam AV, Hira SK (1989). Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of immunoglobulin M to nontreponemal and treponemal antigens for the diagnosis of congenital syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1835-1840.

Penn CW, Cockayne A, Bailey MJ, (1985b). The outer membrane of *Treponema pallidum*: biological significance and biochemical properties. *J. Gen. Microb.* **131**:2349-2357.

Perryman MW, Larsen SA, Hambie EA, Pettit DE, Mullally RL, Whittington W (1982). Evaluation of a new rapid plasma reagin card test as a screening test for syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 286-290.

Petersen LR, Mead RH, Perlroth MG (1983). Unusual manifestations of secondary syphilis occurring after orthotopic liver transplantation. *Am. J. Med.* **75**:166-170.

Pettit, DE, Larsen SA, Pope V, Perryman MW, Adams MR (1881). Unheated serum reagin test as a quantitative test for syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **15**:238-242.

Pettit DE, Larsen SA, Harbec PS, Feeley JC, Parham CE, Cruce DD, Hambie EA, Perryman MW (1983). Toluidine red unheated serum test, a nontreponemal test for syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **18**:1141-1145.

Pham-Kanter GBT, Steinberg MH, Ballard RC (1996). Sexually transmitted diseases in South Africa. *Genitourin. Med.* **72**:160-171.

Philipson A, Sabat LD, Charles D 1973. Transplacental passage of erythromycin and clindamycin. *N. Engl. J. Med.* **288**:1219-1221.

Pietravallo M, Pimpinelli F, Maini A, Capoluongo E, Felici C, D'Auria L, Di Carlo A, Ameglio F (1999). Diagnostic relevance of polymerase chain reaction technology for *T. pallidum* in subjects with syphilis in different phases of infection. *New Microbiol.* **22**:99-104.

Pillay A, Liu H, Chen CY, Holloway B, Sturm AW, Steiner B, Morse S A (1998). Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sex. Trans. Dis.* **8**:408-414.

Pillay A, Liu H, Ebrahim S, Chen CY, Lai W, Fehler G, Ballard RC, Steiner B, Sturm AW, Morse SA (2002). Molecular typing of *Treponema pallidum* in South Africa: cross-sectional studies. *J. Clin. Microbiol.* **40**:256-258.

Piot P, Islam MQ (1994). Sexually transmitted diseases in the 1990s. Global epidemiology and challenges for control. *Sex. Transm. Dis.* **21**(Suppl. 2):S7-13.

Polnikorn, N, Witoonpanich R, Vorachit M, Vejjajiva S, Vejjajiva A (1980). Penicillin concentrations in cerebrospinal fluid after different treatment regimens for syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* **56**:363-367.

- Pope V, Hunter EF, Feeley JC (1982).** Evaluation of the microenzyme-linked immunosorbent assay with *Treponema pallidum* antigen. *J. Clin. Microbiol.* **15**:630-634.
- Pope V, Fears MB (1998).** Spirotestek syphilis: An enzyme immunoassay for treponemal antibodies, In: Larsen SA, Pope V, Johnson R, Kennedy Jr E.J. (Eds), *A manual of tests for syphilis*, 9th edition, American Public Health Association Washington DC, pp. 318-331.
- Pope V, Fears MB (2000).** Serodia *Treponema pallidum* passive particle agglutination (*Treponema pallidum*-PA) test. In: *A manual of tests for syphilis*, supplement. Larsen, SA, Pope V, Johnson, R, Kennedy Jr, E. J. (Ed), 9th ed. Washington DC American Public Health Association pp 363-378.
- Pope V, Fears MB, Morril WE, Castro A, Kikkert SE (2000).** Comparison of the serodia *Treponema pallidum* particle agglutination, Captia syphilis-G, and SpiroTek Reagin II tests with standard test techniques for diagnosis of syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2543-2545.
- Porcella SF, Schwan TG (2001).** *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*: a comparison of functional genomics, environmental adaptations, and pathogenic mechanisms. *J. Clin. Invest.* **107**:651-6.
- Portnoy J, Garson W, Smith CA (1957).** Rapid plasma reagin test for syphilis, *Public Health Rep.* **72**:761-766.
- Portoy J, Bossak HN, Falcone VH, Harris A (1961).** Rapid reagin test with unheated serum and new improved antigen suspension. *Public Health Rep.* **76**:933-935.
- Portoy J, Brewer JH, Harris A (1962).** Rapid plasma reagin card test with for syphilis and other treponematoses. *Public Health Rep.* **77**:645-652.
- Purcell BK, Swancutt MA, Radolf JD (1990).** Lipid modification of the 15 kiloDaltons major membrane immunogen of *Treponema pallidum*. *Mol. Microbiol.* **4**:1371-1379.
- Quinn TC, Glasser D, Cannon RO, Matuszak DL, Dunning RW, Kline RL, Campbell CH, Israel E, Fauci AS, Hook EW III (1988).** Human immunodeficiency virus among patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *N. Engl. J. Med.* **318**:197-203.
- Quinn TC, Cannon RO, Glasser D, Groseclose SL, Brathwaite WS, Fauci AS, Hook EW 3rd. (1990).** The association of syphilis with risk of human immunodeficiency virus infection in patients attending sexually transmitted disease clinics. *Arch. Intern. Med.* **150**:1297-1302.
- Rademacher SE, Radolf JD (1996).** Prominent osseous and unusual dermatologic manifestations of early syphilis in two patients with discordant serological statuses for human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.* **23**:462-467.
- Radolf JD, Chamberlain NR, Clausell A, Norgard MV (1988).** Identification and localization of integral membrane proteins of virulent *Treponema pallidum* susp. *pallidum* by phase partitioning with the detergent triton X-114. *Infect. Immun.* **56**:490-498.
- Radolf JD, Kaplan RP (1988).** Unusual manifestations of secondary syphilis and abnormal humoral immune response to *Treponema pallidum* antigens in a homosexual man with asymptomatic human immunodeficiency virus infection. *J. Am. Acad. Dermatol.* **18**(Suppl):S423-428.
- Radolf JD, Moomaw C, Slaughter CA, Norgard MV (1989).** Penicillin-binding proteins and peptidoglycan of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Infect. Immun.* **57**:1248-1250.
- Radolf JD (1995).** *Treponema pallidum* and the quest for outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **16**:1067-1073.
- Radolf JD, Robison EJ, Bourell KW, Akins DR, Porcella SF, Weigel LM, Jones J D, Norgard MV (1995).** Characterization of outer membranes isolated from *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Infect. Immun.* **63**:4244-4252.
- Radolf JD, Steiner B, Shevchenko D (1999a).** *Treponema pallidum*: doing a remarkable job with what it's got. *Trends Microbiology.* **7**:7-9.
- Radolf JD, Sánchez PJ, Schultz KF, Murphy FK (1999b).** Congenital syphilis. In: Holmes K, Sparling P, Mardh PA, et al., eds. *Sexually Transmitted Diseases*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1165-1188.
- Ratcliffe L, Nicoll A, Carrington D, Wong H, Egglestone SI, Lightfoot NF, Pennington JH,**

- Smith EG, Turner AJ, Zadik PM (1998).** Reference laboratory surveillance of syphilis in England and Wales, 1994 to 1996. *Comm. Dis. Public Health.* **1**:14-21.
- Rathlev T (1965).** Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum*. *WHO/VDT/Res.* **77**:65.
- Reginato AJ (1993).** Syphilitic arthritis and osteitis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **19**:379-398.
- Rein MF (1976)** Biopharmacology of syphilotherapy. *J. Am. Vener. Dis. Assoc.* **3**:109-127.
- Rein MF, Banks G W, Logan L C, Larsen S A, Feeley J C, Kellogg D S, Wiesner P J (1980).** Failure of the *Treponema pallidum* immobilization test to provide additional diagnostic information about contemporary problem sera. *Sex. Transm. Dis.* **3**:101-105.
- Reisner BS, Mann LM, Thocken CA, Waite RT, Woods GL (1997).** Use of the *Treponema pallidum*-specific Captia syphilis IgG assay in conjunction with the rapid plasma reagin to test for syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1141-1143.
- Renton A M, Borisenko K K, Meheus A, Gromyko (1998).** Epidemics of syphilis in the newly independent states of the former Soviet Union. *Sex. Transm. Infect.* **74**:749-750.
- Riley BS, Oppenheimer-Marks N, Hansen EJ, Radolf JD, Norgard MV (1992).** Virulent *Treponema pallidum* activates human vascular endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **165**:484-493.
- Rishbud A, Chan-Tack K, Gadkari D, Gangakhedkar RR, Shepherd ME, Bollinger R, Mehendale S, Gaydos C, Divekar A, Rompalo A, Quinn TC. (1999).** The etiology of genital ulcer disease by multiplex polymerase chain reaction and relationship to HIV infection among patients attending sexually transmitted disease clinics in Pune, India. *Sex Transm Dis.* **26**:55-62.
- Riviere GR, Thomas DD, Cobb CM (1989).** An in vitro model of *Treponema pallidum* invasiveness. *Infect. Immun.* **57**:2267-2271.
- Riviere GR, Wagoner MA, Baker-Zander SA, Weisz KS, Adams DF, Simonson L, Lukehart SA (1991a).** Identification of spirochetes related to *Treponema pallidum* in necrotizing ulcerative gingivitis and chronic periodontitis. *N. Engl. J. Med.* **325**:539-543.
- Riviere GR, Weisz KS, Adams DF, Thomas DD. (1991b).** Pathogen-related oral spirochetes from dental plaque are invasive. *Infect. Immun.* **59**:3377-3380.
- Rodes B, Liu H, Johnson S, George R, Steiner B (2000).** Cloning and characterization of a gene (polA) coding for a an unusual DNA polymerase I from the obligate parasite *Treponema pallidum*. *J. Med. Microbiol.* **49**:657-667.
- Rodrigues JCF, Silva MR 1987.** A terapêutica antilúética no antigamente. *Bol. Clin HCL.* **44**:121-136.
- Rogers MF, Morens DM, Stewart JA, Kaminski RM, Spira TJ, Feorino PM, Larsen SA, Francis DP, Wilson M, Kaufman L (1983).** National case-control study of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men: Part 2.Laboratory results. *Ann. Intern. Med.* **99**:151-158.
- Rolfs RT, Joesoef MR, Hendershot EF, Rompalo AM, Augenbraun MH, Chiu M, Bolan G, Johnson SC, French P, Steen E, Radolf JD, Larsen S (1997).** A randomised trial of enhanced therapy for early syphilis in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **337**:307-314.
- Romanowski B, Forsey E, Prasad E, Lukehart SA, Tam M, Hook III EW (1987).** Detection of *Treponema pallidum* by a fluorescent monoclonal antibody test. *Sex. Transm. Dis.* **14**:156-159.
- Romanowski B, Sutherland R, Fick GH, Mooney D, Love EJ (1991).** Serological response to treatment of infectious syphilis. *Ann. Intern. Med.* **114**:1005-1009.
- Romero-Jimenez MJ, Suarez Lozano I, Fajardo Pico JM, Baron Franco B (2003).** Malignant syphilis in patient with human immunodeficiency virus (HIV): case report and literature review. *Ann. Med. Interna.* **20**:373-376.
- Rompalo, AM, Cannon RO, Quinn TC, Hook EW III (1992).** Association of biologic false-positive reactions for syphilis with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **165**:1124-

1126.

- Rompalo AM (2001a).** Can syphilis be eradicated from the world?. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **14**:41-44.
- Rompalo AM, Lawor J, Seaman P, Quinn TC, Zenilman JM, Hook EW (2001b).** Modification of syphilis genital ulcer manifestations by coexistent HIV infection. *Sex. Transm. Dis.* **28**:448-454.
- Rosa PA, Schwan TG (1989).** A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* **160**:1018-1029.
- Ross EB (1995).** Syphilis, misogyny, and witchcraft in 18th century Europe. *Curr. Anthropol.* **36**:333-337.
- Ross WH, Sutton HF (1980).** Acquired syphilitic uveitis. *Arch. Ophthalmol.* **98**:496.
- Ruby J, Li H, Kuramitsu H, Norris SJ, Goldstein SF, Buttle KF, Charon NW (1997).** Relationship of *Treponema denticola* periplasmic flagella to irregular cell morphology. *J. Bacteriol.* **179**:1628-1635.
- Ruby JD, Charon NW (1998).** Effect of the temperature and viscosity on the motility of the spirochete *Treponema denticola*. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**:251-154.
- Rusnak JM, Butzin C, MacGlason D, Blatt SP (1994).** False positive rapid plasma reagin test in human immunodeficiency virus infection and relationship to anticardiolipin antibody and serum immunoglobulin levels. *J. Infect. Dis.* **169**:1356-1359.
- Saiki RK, Gelfand D H, Stoffer S Scharf SJ, Higushi R, Horn GR, Mullis KB, Erlich HA (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**:487-491.
- Saiki RK (1989).** The design and optimization of the PCR, p. 7-16 In Erlich HA (Ed.), *PCR Technology: Principles and applications for DAN amplication*. Stockton Press New York.
- Salazar JC, Hazlett KRO, Radolf JD (2002).** The immune response to infection with *Treponema pallidum* the stealth pathogen. *Microbes. Infect.* **4**:1133-1140.
- Sambri V, Marangoni A, Simone MA, D'Antuono A, Negosanti M, Cevenini R. (2001a).** Evaluation of recomWell Treponema, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**:200-205.
- Sambri V, Marangoni A, Eyer C, Reichhuber C, Soutschek E, Negosanti M, D'Antuono A, Cevenini R (2001b).** Western immunoblotting with five *Treponema pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of syphilis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**:534-539.
- Sanchez PJ, McCracken GH, Jr Wendel GD, Olsen K, Threlkeld N, Norgard MV (1989).** Molecular analysis of the fetal IgM response to *Treponema pallidum* antigens: implications for improved serodiagnosis of congenital syphilis. *J. Infect. Dis.* **159**:508-517.
- Sanchez PJ, Wendel GD, Grimprel E, Goldberg M, Hall M, Arencibia-Mireles O, Radolf JD, Norgard MV (1993).** Evaluation of molecular methodologies and rabbit infectivity testing for diagnosis of congenital syphilis and neonatal central nervous invasion by *Treponema pallidum*. *J. Infect. Dis.* **167**:148-157.
- Sands M, Markus A (1995).** Lues maligna or ulceronodular syphilis, in man infected with human immunodeficiency virus: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **20**:387-390.
- Sartin JS, Perry HO (1995).** From mercury to malaria to penicillin: the history of the treatment of syphilis at the Mayo Clinic. *J. Am. Acad. Dermatol.* **32**:255-261.
- Sato NS, Hirata MH, Hirata DC, Zerbini MS, Silveira PR, Melo CS, Euda M (1999).** Analysis of *Treponema pallidum* recombinant antigens for diagnosis of syphilis by western blotting technique. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **41**:115-118.
- Sato NS, Melo CS, Zerbini LC, Silveira EP, Fagundes LJ, Ueda M (2003).** Assessment of the rapid test based on an immunochromatography technique for detecting anti-*Treponema pallidum* antibodies. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **45**:319-322.
- Schlaegel TF, Kao SF (1982).** A review (1970-1980) of 28 presumptive cases of syphilitic uveitis. *Am. J. Ophthalmol.* **93**:412-414.

- Schmid GP (1996).** Serologic screening for syphilis. Rationale, cost and realpolitik. *Sex. Transm. Dis.* **23**:45-50.
- Schmidt BL, Luger A, Duschet P, Seifert W, Gschnait F (1994).** Specific IgM tests in syphilis diagnosis. *Hautarzt.* **45**:685-689.
- Schmidt BL, Edjlalipour M, Luger A (2000).** Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patient with primary syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1279-1282.
- Schober PC, Gabriel G, White P, Felton WF, Thin RN (1983).** How infectious is syphilis? *Br. J. Vener. Dis.* **59**:217-219.
- Schofer H, Imhof M, Thoma-Greber E, Brockmeyer NH, Hartmann M, Gerken G, Pees HW, Rasokat H, Hartmann H, Sadri I, Emminger C, Stellbrink HJ, Baumgarten R, Plettenberg A (1996).** Active syphilis in HIV infection: a multicentre retrospective study. The German AIDS Study Group (GASG). *Genitourin. Med.* **72**:176-181.
- Schouls LM, Ijsselmuiden OE, Weel J, Embden JD A (1989).** Overproduction and purification of *Treponema pallidum* recombinant-DNA-derived proteins TmpA and TmpB and their potential use in serodiagnosis of syphilis. *Infect. Immun.* **57**:2612-2623.
- Schrijvers D, Josse R, Trebucq A, Dupont A, Cheringou Larouze HB (1989).** Transmission of syphilis between sexual partners in Gabon. *Genitourin. Med.* **65**:84-85.
- Schroeter AL, Turner RH, Lucas JB, Brown W (1971).** Therapy for incubating syphilis: effectiveness of gonorrhea treatment. *JAMA.* **218**:711-713.
- Schroeter AL, Lucas JB, Price EV, Falcone VH (1972).** Treatment for early syphilis and reactivity of serologic tests. *JAMA.* **221**:471-476.
- Scotti, AT, Logan L (1968).** A specific IgM antibody test in neonatal congenital syphilis. *J. Pediatr.* **73**:242-243.
- Sellati TJ, Waldrop SL, Salazar JC, Bergstresser PR, Picker LJ, Radolf JD (2001).** The cutaneous response in humans to *Treponema pallidum* lipoprotein analogues involves cellular elements of both innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* **166**:4131-4140.
- Shalaby IA, Dunn JP, Semba RD, Jabs DA (1997).** Syphilitic uveitis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Arch. Ophthalmol.* **115**:469-473.
- Shannon R, Booth SD (1977).** The pattern of immunological responses at various stages of syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* **53**:281-286.
- Shevchenko DV, Akins DR, Robinson EJ, Li M, Shevchenko OV, Radolf JD (1997).** Identification of homologs for thioredoxin, peptidyl prolyl cis-trans isomerase, and glycerophosphodiester phosphodiesterase in outer membrane fractions from *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Infect. Immun.* **65**:4179-4189.
- Shevchenko DV, Sellati TJ, Cox DL, Shevchenko OV, Robinson EJ, Radolf JD (1999).** Membrane topology and cellular location of *Treponema pallidum* glycerophosphodiester (GlpQ) ortholog. *Infect. Immun.* **76**:2266-2276.
- Shin DLT, Kass MA, Kolkow AE (1976).** Positive FTA-abs tests in subjects with corticosteroid-induced uveitis. *Am. J. Ophthalmol.* **86**:259.
- Shore RN (1967).** Hemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum*. *Br. J. Vener. Dis.* **43**:181-185.
- Shore RN, Faricelli JA (1977).** Bordeline and reactive FTA-Abs results in lupus erythematosus. *Arch. Dermatology.* **113**:37-41.
- Shuber AP, Skolesky j, Stern R, Handelin Bl (1993).** Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Hum. Mol. Genet.* **2**:153-158.
- Silletti RP (1995).** Comparison of Captia syphilis G with rapid plasma regain test for detection of syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1829-1831.
- Simon RP (1985).** Neurosyphilis. *Arch. Neurol.* **42**:606-613.
- Simonsen JN, Cameron DW, Gakinya MN, Ndinya-Achola JO, D'Costa LJ, Karasira P, Cheang**

- M, Ronald AR, Piot P, Plummer FA (1988).** Human immunodeficiency virus infection among men with sexually transmitted diseases. Experience from a center in Africa. *N. Engl. J. Med.* **319**:274-278.
- Singh AE, Romanowski B (1999).** Syphilis: Review with Emphasis on Clinical, Epidemiologic, and Some Biologic Features. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:187-209.
- Smith ME, Canalis RF (1989).** Otologic manifestations of AIDS: The otosyphilis connection. *Laryngoscope.* **99**:365-372.
- Smith JL, Israel CW, McCrary JA, Harner RE (1968).** Recovery of *Treponema pallidum* from aqueous humor removed at cataract surgery in man by passive transfer to rabbit testis. *Am. J. Ophthalmol.* **65**:242-247.
- Snijders PJ, Van den Brule AJC, Schrijnemakers HFJ, Meijer CJLM, Walboomers JMM (1990).** The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papilloma-virus genotypes. *J. Gen. Virol.* **71**:173-181.
- Spangler AS, Jackson JH, Fiumara NJ, Warthin TA (1964).** Syphilis with a negative blood test reaction. *JAMA.* **189**:87-90.
- Sparling PF (1971).** Diagnosis and treatment of syphilis. *N. Engl. J. Med.* **284**:642-653.
- Sparling PF (1990).** Natural history of syphilis. p. 213-219. In: Holmes, KK, Mardh PA, Sparling PF, Wiesner PJ, Cates W, Lemon SM, Stamm WE (ed.). *Sexually transmitted diseases* 2nd edition. New York: McGraw—Hill Information Services Co.
- Sparling PF (1999).** Natural history of syphilis. p. 473-479. In: Holmes, KK, Mardh PA, Sparling PF, Wiestner PJ, Cates W, Lemon SM, Stamm WE, (ed.) *Sexually transmitted diseases* 3rd edition. New York: McGraw—Hill Information Services Co.
- Spoor TC, Wynn P, Hartel WC, Bryan CS (1983).** Ocular syphilis. Acute and chronic. *J. Clin. Neuroophthalmol.* **3**:197-203.
- Srinivasan G, Ramamurthy RS, Rharathi A, Voora S, Pildes RS (1983).** Congenital syphilis: a diagnostic and therapeutic dilemma. *Pediatr. Infect. Dis.* **2**:436-441.
- St. Louis ME (1996).** Strategies for syphilis prevention in the 1990s. *Sex. Transm. Dis.* **23**:58-67.
- St. Louis ME, Wasserheit JN (1998).** Elimination of syphilis in the United States. *Science.* **281**:353-354.
- Stamm LV, Greene SR, Bergen HL, Hardham JM, Barnes NY (1998).** Identification and sequence analysis of *Treponema pallidum* *tpoJ*, a member of a polymorphic multigene family. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**:155-163.
- Stamm LV (1999).** Biology of *Treponema pallidum* pp.467-472 In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, Lemon SM, Piot PP, Wasserheit JN (ed.). *Sexually Transmitted Diseases*: 3rd edition. New York: McGraw—Hill.
- Stamm WE, Handsfield HH, Rompalo AM, Ashley RL, Roberts PL, Corey L (1988).** The association between genital ulcer disease and acquisition of HIV infection in homosexual men *JAMA.* **260**:1429-1433.
- Stanton TB, Jensen NS, Casey TA, Tordoff LA, Dewhirst FE, Paster BJ. (1991).** Reclassification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a new genus, *Serpula* gen. nov., as *Serpula hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpula innocens* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:50-58.
- Stanton TB, Rosey EL, Kennedy MJ, Jensen NS, Bosworth BT (1999).** Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NDA oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* etiologic agent of swine dysentery. *Appl. Environ Microbiol.* **65**: 5028-5034.
- Steele RW 1984.** Ceftriaxone therapy and serious infections. *Am. J. Med.* **77**: (Suppl 4c):S50-53.
- Sterk C (1988).** Cocaine and HIV seropositivity. *Lancet.* **2**:1052.
- Stoll BJ, Lee FK, Larsen SA, Hale E, Schwartz D, Rice RJ, Ashby R, Holmes R, Nahmias AJ (1993).** Clinical and serological evaluation of neonates for congenital syphilis: a continuing

- diagnostic dilemma. *J. Infect. Dis.* **167**:1093-1099.
- Strom T, Schneck SA (1991).** Syphilis meningomyelitis. *Neurology*. **41**:325-326.
- Strugnell R, Cockayne A, Penn CW (1990).** Molecular and antigenic analysis of treponemas. *Crit. Rev Microbiol.* **17**:231-250.
- Sutton MY, Liu H, Steiner B, Pillay A, Mickey T, Finelli L, Morse S, Markowitz LE, St. Louis ME (2001).** Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in Arizona County with increasing syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood. *J. Inf. Diseases*, **183**:1601-1606.
- Swancutt MA, Radolf JD, Nogard MV (1990).** The 34-kilodalton membrane immunogen of *Treponema pallidum* is a lipoprotein. *Infect. Immun.* **58**:384-392.
- Swartz MN, Healy BP, Musher DM (1999).** Late syphilis. In: Holmes K, Sparling P, Mardh PA, et al., eds. *Sexually Transmitted Diseases*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, pp.:487-509.
- Tamesis RR, Foster CS (1990).** Ocular syphilis. *Ophthalmology*. **97**:1281-1287.
- Terpstra WJ, Schoone GJ, Ter Scogegget J (1986).** Detection of leptospiral DNA by nucleic acid hybridisation with 32P and biotin-labelled probes. *J. Clin. Microbiol.* **22**:23-28.
- Terry PM, Page ML, Goldmeier D (1988).** Are serological tests of value in diagnosing and monitoring response to treatment of syphilis in patients infected with Human Immunodeficiency Virus? *Genitour. Med.* **64**:219-222.
- Thomas DD, Baseman JB, Alderete JF (1975).** Putative *Treponema pallidum* adhesins share a common functional domain. *Infect. Immun.* **49**:833-835.
- Thomas DD, Navab M, Haake DA, Fogelman AM, Miller JN, Lovett MA (1988).** *Treponema pallidum* invades intercellular junctions of endothelial cell monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:3608-3612.
- Thomas DL, Rompalo AM, Zenilman J, Hoover D, Hook EW 3rd, Quinn TC (1994).** Association of hepatitis C virus infection with false-positive tests for syphilis. *J. Infect. Dis.* **170**:579-81.
- Thorton JG, Foote GA, Page CE, Clayden AD, Tovey CA D, Scott JS (1987).** False positive results of tests for syphilis and outcome of pregnancy: a retrospective case-control study. *Br. Med. J.* **295**:355-356.
- Tichonova L, Borisenko K, Ward H, Meheus A, Gromyko A, Renton A (1997).** Epidemics of syphilis in the Russian Federation: trends, origins, and priorities for control. *Lancet*. **350**:210-213.
- Tikjob G, Russel M, Petersen CS, Gerstoft J, Kobayasi T (1991).** Seronegative secondary syphilis in a patient with AIDS: Identification of *Treponema pallidum* in biopsy specimen. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**:506-508.
- Tomberlin MG, Holtom PD, Owens JL, Larsen RA (1994).** Evaluation of neurosyphilis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Clin. Infect. Dis.* **18**:288-294.
- Tomizawa T, Kazamatsu S (1969).** Hemagglutination test for diagnosis of syphilis. A preliminary report. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **19**:305-308.
- Tosca A, Lehou J, Hatjivasiliou M, Varelzidis A, Stratigos JD (1988).** Infiltrate of syphilitic lesions before and after treatment. *Genitourin. Med.* **64**:289-293.
- Tosca A, Stavropoulos PG, Hatzilou E, Arvanitis A, Stavrianeas N, Hatzivassiliou M, Stratigos JD (1990).** Malignant syphilis in HIV-infected patients. *Int. J. Dermatol.* **29**:575-578.
- Tramont EC (1976).** Persistence of *Treponema pallidum* following penicillin G therapy: Report of two cases. *JAMA*. **236**:2206-2207.
- Tramont EC (1987).** Syphilis in the AIDS era. *N. Engl J Med.* **316**:1600-1601.
- Tramont EC (1990).** Spirochetes. *Treponema pallidum* (syphilis). In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell G L, Douglas RG, Bennett J E, (Ed.), 3th ed. New York: Churchill Livingstone, pp.1794-1808.
- Tramont EC (1995a).** Syphilis in adults: From Christopher Columbus to Sir Alexander Fleming

- to AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **21**:1361-1369.
- Tramont EC (1995b).** Spirochetes. *Treponema pallidum* (syphilis). In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell G L, Bennett J E, Dalin R, (Ed.), 4th ed. New York: Churchill Livingstone, pp.2117-2133.
- Tucker SC, Yates VM, Thambar IV (1997).** Unusual skin ulceration in an HIV-positive patient who had cutaneous syphilis and neurosyphilis. *Br. J. Dermatol.* **136**:946-948.
- Tuffanelli DL (1966).** Aging and false-positive reactions for syphilis. *Br. J. Venereal Dis.* **42**:40-41.
- Turner TB, Hollander DH (1957).** Biology of the Treponematoses, *Monograph Series* N° 35, World Heath Organization, Geneva.
- Turner TB, Hardy PH, Newman B (1969).** Infectivity tests in syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* **45**:183-196.
- Tyler KL, Sandberg E, Baum KF (1994).** Medical medullary syndrome and meningovascular syphilis: A case report in an HIV-infected man and a review of the literature. *Neurology.* **44**:2231-2235.
- Van der Sluis JJ, Onvlee PC, Kothe FC, Vuzevski VD, Aelbers GM, Menke HE (1984).** Transfusion syphilis, survival of *Treponema pallidum* in donor blood. Report of an orientating study. *Vox. Sang.* **47**:197-204.
- Van der Sluis JJ, ten Kate FJ, Vuzevski VD, Kothe FC, Aelbers GM, van Eijk RV (1985).** Transfusion syphilis, survival of *Treponema pallidum* in donor blood. II. Dose dependence of experimentally determined survival times. *Vox. Sang.* **49**:390-399.
- Van der Valk PG, Kraai EJ, van Voorst Vader PC, Haaxma-Reiche H, Snijder JA (1988).** Penicillin concentrations in cerebrospinal fluid (CSF) during repository treatment regimen for syphilis. *Genitourin. Med.* **64**:223-225.
- Van Dyck E, Van de Velden LC, Ndoeye I, Piot P, Meheus A (1993).** Evaluation of the rapid plasma reagin "teardrop" card test for screening of syphilis in field conditions. *Sex. Transm. Dis.* **20**:194-197.
- Van Voorhis WC, Barrett LK, Koelle DM, Nasio JM, Plummer FA, Lukehart SA (1996).** Primary and secondary syphilis lesions contain mRNA for Th1 cytokines. *J. Infect. Dis.* **173**:491-495.
- Van Voorhis WC, Barrett LK, Lukehart SA, Schmidt B, Schrieffer M, Cameron CE. (2003).** Serodiagnosis of syphilis: antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by *Treponema pallidum*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3668-3674.
- Veldkamp J, Visser AM (1975).** Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* **51**:227-231.
- Verdon MS, Handsfield HH, Johnson RB (1994)** Pilot study of azithromycin for treatment of primary and secondary syphilis. *Clin. Infect. Dis.* **19**: 486-488.
- Viscidi RP, Yolken RG (1987).** Molecular diagnosis of infectious diseases by nucleic acid hybridization. *Mol. Cell. Probes* **1**:3-14.
- Walker EM, Zampighi GA, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA (1989).** Demonstration of rare protein in the outer membrane of *Treponema pallidum* of subsp. *pallidum* by freeze-fracture analysis. *J. Bacteriol.* **171**:5005-5011.
- Wallace AL, Norins LC (1969).** Syphilis serology today. In *Progress in Clinical Pathology*, vol.2, ed. Stefanini M, Grune & Stratton, New York, 198-215.
- Weinstock GM, Hardham JM, McLeod MP, Sodergren EJ, Norris SJ. (1998).** The genome of *Treponema pallidum*: new light on the agent of syphilis. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:323-332.
- Wentworth BB, Thopson MA, Peter CR, Bawdon RE, Wilson DL (1978).** Comparison of a hemagglutination treponemal test for syphilis (HATTS) with other serological methods for diagnosis of syphilis. *Sex. Transm. Dis.* **5**:103-111.

- Wheater CP, Cook PA, Clark P, Syed Q, Bellis MA. (2003).** Re-emerging syphilis: a detrended correspondence analysis of the behaviour of HIV positive and negative gay men. *BMC. Public. Health.* **3**:34.
- White TJ, Fuller SA (1989).** Visuwell Reagin, a non-treponemal enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **27**:2300-2304.
- WHO Office of HIV/AIDS and STDs (1995).** An overview of selected curable STDs. Syphilis estimates, 1995. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wicher K, Wos SM, Wicher V (1986).** Kinetics of antibody response to polypeptides of pathogenic and nonpathogenic treponemes in experimental syphilis. *Sex. Transm. Dis.* **13**:251-257.
- Wicher K, Jakubowski A, Wicher V (1987)** Humoral response in *Treponema pallidum*-infected guinea pigs: I. Antibody specificity. *Clin. Exp. Immunol.* **69**:263-270.
- Wicher V, Zabek J, Wicher K (1991).** Pathogen-specific humoral response in *Treponema pallidum*-infected humans, rabbits, and guinea pigs. *J. Infect. Dis.* **163**:830-836.
- Wicher K, Noordhoek GT, Abbruscato F, Wicher V (1992).** Detection of *Treponema pallidum* in early syphilis by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 497-500.
- Wicher K, Abbruscato F, Wicher V, Baugh RE, Noordhoek GT (1996).** Target organs of infection in guinea pigs with acquired or congenital syphilis. *Infect. Immun.* **64**:3174-3179.
- Wicher K, Abbruscato F, Wicher V, Collins DN, Auger I, Horowitz HW (1998).** Identification of persistent infection in experimental syphilis by PCR. *Infect. Immun.* **66**:2509-2513.
- Wicher K, Horowitz HW, Wicher V (1999).** Laboratorial methods of diagnosis of syphilis for the beginning of the third millennium. *Microbes. Infect.* **1**:1035-1049.
- Wilkinson HW, Sampson JS, Plikaytis BB (1986).** Evaluation of a commercial gene probe for identification of *Legionella* cultures. *J. Clin. Microbiol.* **23**:217-220.
- Willcox RR, Guthe T (1966).** *Treponema pallidum*. A bibliographical review of the morphology, culture and survival of *T. pallidum* and associated organisms. *Bull. W.H.O.* **35**:1-169.
- Willcox RR (1973).** 'Epidemiologic treatment' in non-venereal and in treponemal diseases. *Br. J. Vener. Dis.* **49**:107-115.
- Winters HA, Notar-Francesco V, Bromberg K, Rawstrom SA, Vetrano J (1992).** Gastric syphilis: five recent cases and a review of the literature. *Ann. Intern. Med.* **116**:314-319.
- Woods SA, Cole ST (1989).** A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**:305-310.
- World Health Organization (2001).** Guidelines for the management of sexually transmitted infections. *World Health Organization*, Geneva, Switzerland.
- World Heath Organization (2003).** The sexually Transmitted Diseases Diagnostic Initiative (SDI). Laboratory-basead evaluation of rapid syphilis diagnostic. Retirado a 7 de Setembro de 2003 de www.who.int/std_diagnostic.
- Yelton DB, Limberger RJ, Curci K, Malinosky-Rummel F, Slivienski L, Schouls LM, van Embden JD Charon NW (1991).** *Treponema phagedenis* encondes and expresses homolgs of *Treponema pallidum* TmpA and TmpB proteins. *Infec. Immun.* **59**:3685-3693.
- Yim CW, Flynn NM, Fitzgerald FT (1985).** Penetration of oral doxycycline into the cerebrospinal fluid of patients with latent or neurosyphilis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**:347-348.
- Yobs AR, Brown L, Hunter EF (1964).** Fluorescent antibody technique in early syphilis. *Arch. Pathol.* **77**:220-225.
- Yobs AR, Clark JW Jr, Mothershed SE, Bullard JC, Artley CW (1968).** Further observations on the persistence of *Treponema pallidum* after treatment in rabbits and humans *Br. J. Vener. Dis.* **44**:116-130.
- Yoder FW (1975).** Penicillin treatment of neurosyphilis. Are recommended dosages sufficient? *JAMA.* **232**:270-271.
- Young EJ, Weingarten NM, Baughn RE, Duncan WC (1982).** Studies on the pathogenesis of the

- Jarisch-Herxheim reaction. *J. Infect. Dis.* **146**:606-615.
- Young H (1992a).** Syphilis: new diagnostic directions. *Int. J. STD AIDS.* **3**:391-413.
- Young H, Moyes A, McMillan Patterson A (1992b).** Enzyme immunoassay for anti-treponemal IgG: screening or confirmatory test? *J. Clin. Pathol.* **45**:37-41.
- Young H, Walker P J, Merry D, Mifsud A (1994).** A preliminary evaluation of a prototype western blot confirmatory test kit for syphilis. *Int. J. STD. AIDS.* **5**:409-414.
- Young H, Moyes A, Seargar L, McMillan A (1998).** Novel recombinant-antigen enzyme immunoassay for serological diagnosis of syphilis. *J. Clin. Microbiol.* **36**:913-917.
- Young H (2000).** Guidelines for serological testing for syphilis. *Sex. Transm. Dis.* **76**:403-405.
- Yuo Y, Elmore S, Colton LL, Mackenzie C, Stoops JK, Weinstock GM, Norris SJ (1996).** Characterization of cytoplasmic filament protein gene (*cfpA*) of *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*. *J. Bacteriol.* **178**:3177-3187.
- Zangerberg G, Saiki RK, Reynolds R (1999).** Multiplex PCR: optimization guidelines. *In: PCR application.* Academic Press.
- Zarakolu P, Buchanan I, Tam M, Smith K, Hook EW 3rd (2002).** Preliminary evaluation of an immunochromatographic strip test for specific *Treponema pallidum* antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3064-3065.
- Zhang HH, Blanco DR, Exner MM, Shang ES, Champion CI, Phillips ML, Miller JN, Lovett MA. 1999.** Renaturation of recombinant *Treponema pallidum* rare outer membrane protein 1 into a trimeric, hydrophobic, and porin-active conformation. *J. Bacteriol.* **181**(23):7168-7175.
- Zrein M, Maure I, Boursier F, Soufflet L (1995).** Recombinant antigen-based enzyme immunoassay for screening of *Treponema pallidum* antibodies in blood bank routine. *J. Clin. Microbiol.* **33**:525-527.